

**METHODISCHE UNTERSUCHUNG ZUR
KINETISCHEN ADH - BESTIMMUNG DES ETHANOLS**

BEATE FAUST

~~1987~~

Disbui. München
1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München
Vorstand : Prof. Dr. med. W. Spann

Methodische Untersuchung zur kinetischen ADH-Bestimmung
des Ethanols

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Beate Faust
aus
München

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter :	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. L. v. Meyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Spann
Dekan:	Prof. Dr. med. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	29. 03. 1988

Für meine lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Stoffwechsel des Alkohols
3. Methoden der Literatur zur Blutalkoholbestimmung
 - 3.1. Widmark Methode
 - 3.2. Gaschromatographie
 - 3.3. ADH-Verfahren
 - 3.3.1. Manuelles und automatisches ADH-Verfahren mit Endpunktbestimmung
 - 3.3.2. Verfahren zur Messung der Enzymkinetik von ADH
4. Zusammenfassung der ADH-Methode von Brown und Portman
5. Eigene Untersuchungen
 - 5.1. Methodik und Reagentien
 - 5.1.1. Methodik
 - 5.1.2. Reagentien
 - 5.2. Bestimmung des Verdünnungsverhältnisses an Alkoholstandards
 - 5.3. ADH-Mengenbestimmung
 - 5.4. Bestimmung der Meßzeit
 - 5.5. Erstellung von Eichkurven mit Hilfe von bestimmten Alkoholstandards
6. Empirisch gefundene Versuchsanordnungen an Hand von Alkoholstandardlösungen
7. Resultate der Blut- und Serumalkoholbestimmungen
 - 7.1. Schriftliche Zusammenfassung
 - 7.2. Graphik der Ergebnisse
 - 7.3. Tabelle der gefundenen Alkoholwerte
8. Diskussion
9. Zusammenfassung
10. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Die zentrale Bedeutung von Blutalkoholbefunden für die forensische Beurteilung von Straftaten, die unter Alkoholeinfluß begangen wurden, hat dazu geführt, daß heute sehr hohe Anforderungen an die Labordiagnostik für die Blutalkoholbestimmung gestellt werden.

Auch in vielen anderen klinischen Disziplinen, besonders in der inneren Medizin, Neurologie, Psychiatrie und der Notfalldiagnostik ergeben sich in der Praxis oft Schwierigkeiten bei der Differentialdiagnostik komatöser Zustände, sodaß die exakte Bestimmung des Blutalkohols einen hohen Stellenwert besitzt.

Deswegen ist es auch verständlich, daß einer zuverlässigen und schnell durchführbaren Methode die größte Bedeutung zukommt.

Nach den Richtlinien des 1. Gutachtens des Bundesgesundheitsamtes (Lundt 1966), soll aber die Bestimmung der Blutalkoholkonzentration (BAK) nicht nach einer, sondern nach zwei nebeneinander laufenden Methoden erfolgen, denen ein unterschiedliches naturwissenschaftliches Prinzip zugrunde liegt.

Nach Grüner (1967) können zur Alkoholbestimmung beispielsweise sowohl die physikalischen (spezifisches Gewicht, Leitfähigkeit, Siedepunkt, Dampfdruck, Lichtbrechung), als auch die chemischen Eigenschaften (Reduktionsvermögen, enzymatische Oxidierbarkeit) des Alkohols herangezogen werden.

Zur Methode der enzymatischen Oxidierbarkeit gehört die ADH-Methode, die üblicherweise nach Bonnichsen R. und Theorell H., sowie Bücher T. und Redetzki H. (1951) als Endpunktbestimmung durchgeführt wird. Die Methode gilt als alkoholspezifisch, wenn gleich sie nicht spezifisch für Ethanol alleine ist.

Hier in dieser Arbeit sollte versucht werden, ein beschriebenes kinetisches ADH-Verfahren in Hinblick auf seine Zuverlässigkeit, Richtigkeit und deren Präzision (von Brown et al. 1971, und Portman 1980) zu prüfen, um diese Methode möglicherweise auch für den Routinebetrieb bei der Blutalkoholanalyse einzusetzen.

2. Stoffwechsel des Alkohols

Der allgemein verbreitete Alkoholkonsum erfordert eine Stellungnahme zu seinen Auswirkungen auf den Körper, da der Alkohol meist nicht als eine Droge, sondern als ein spezielles Genußmittel mit fragwürdigem Nährwert und interessanten psychogenen Effekten betrachtet wird; oft wird dabei vergessen, daß er zu einer Vielzahl von Veränderungen in verschiedenen Bereichen des Stoffwechsels führen kann. Oft wird auch nicht erkannt, daß der Alkohol mit 7,1 kcal/g zu einer Fehlernährung führen kann, da es "leere Kalorien" sind, die nicht mit aufbauenden Proteinen, Mineralstoffen, oder Vitaminen verbunden sind.

Weniger als 10% wird von dem aufgenommenen Alkohol durch die Lunge wieder abgegeben, während 90% mit einer Rate von 5-10 ml/h mit einer Kinetik 0. Ordnung abgebaut werden (Nahas G. G. 1984).

Der erste Schritt des Alkoholabbaus wird durch die ADH in der Leberzelle katalysiert, wobei das Enzym Wasserstoffatome vom Ethanol zu NAD überträgt und gleichzeitig Ethanol zu Acetaldehyd umwandelt.

Da der Alkoholabbau in der Leber durch die ADH (Alkoholdehydrogenase) mit einer gewissen Konstanz erfolgt, wurde von Widmark der Faktor β als individuell schwankender Parameter für die Größe des Alkoholabbaus im Blut eingeführt. Der Abbauwert β_{60} liegt dabei meistens zwischen 0,10-0,15 ‰ (Grenzwert 0,08-0,25 ‰) pro Stunde.

Ein zweiter Abbauweg, der erst bei einem hohen Alkoholspiegel in Aktion tritt, ist im Endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle lokalisiert und wird Mikrosomal Ethanol Oxidizing System (MEOS) genannt. Der Alkohol wird dabei auch zu Acetaldehyd transformiert, als Cofaktor wird aber das NADPH benötigt.

Das entstandene Acetaldehyd wird dann in der Leber zu Acetat oxidiert, das dann schließlich zu CO_2 und H_2O umge-

wandelt wird.

Eine Vielzahl der Stoffwechselwirkungen des Alkohols sind direkt mit den 2 ersten Oxidationsprodukten, nämlich den Wasserstoffionen und dem Acetaldehyd verbunden.

So kann der Überschuss an Wasserstoffionen die Zellaktivität der Leber aus dem Gleichgewicht bringen, da die Zelle versucht, jene in einem oder mehreren der verschiedenen wasserstoffabhängigen Stoffwechselwegen loszuwerden.

Einer dieser Möglichkeiten besteht darin, Aminosäuren in Glucose umzuwandeln, wobei Pyruvat als Zwischenprodukt fungiert. Bei einem Überschuß an Wasserstoffionen wird Pyruvat zu Lactat reduziert, wobei die Gluconeogenese blockiert wird und der Blutzuckerspiegel sinkt.

Diese Hemmung ist schon bei einem Blutalkoholspiegel von 0,45⁰/oo nachzuweisen (Dietze G. et al. 1973).

Oft wird bei einem niedrigen Blutzuckerspiegel übersehen, daß dieser Zustand durch einen akuten Alkoholmißbrauch hervorgerufen wurde.

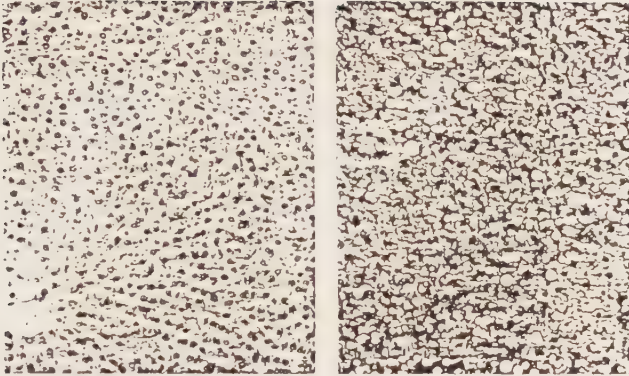
Es gibt noch andere Wege diese Wasserstoffionen zu verwerten. So können sie direkt in die Synthese von Δ -Glycerophosphat und Fettsäuren eingeschleust werden. Diese Verbindungen stellen die direkten Vorläufer von Triglyceriden dar, die dann als Fette in der Leberzelle gespeichert werden.

Eine sogenannte Fettleber (siehe Abb.1) stellt sich dann folgendermaßen dar: Vergrößerung der Mitochondrien, die dabei auch noch verzerrt wirken und eine Anreicherung des glatten Endoplasmatischen Retikulums, da dort verstärkt Lipoproteine synthetisiert werden.

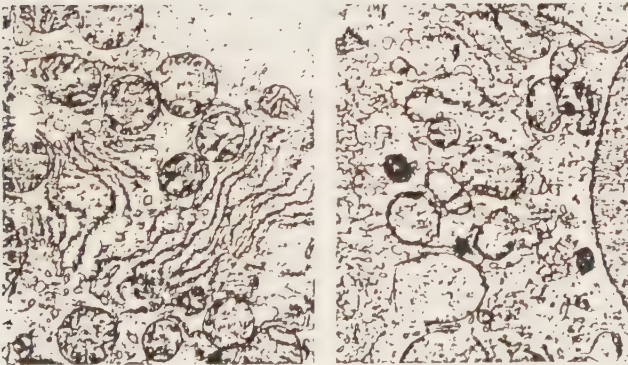
So eine Fettleber kann dann in schlimmen Fällen (bei ca. 50 ml Alkohol/Tag) zur alkoholischen Hepatitis und Leberzirrhose mit möglichem Tod führen.

Es scheint auch, daß das Acetaldehyd eine zentrale Stellung für die Toxizität des Alkohols spielt, da es sehr reaktionsfreudig ist.

Abb. 1



Fettleber bei 240-facher Vergrößerung (rechts); links normale Leber



Mikrostrukturelle Unterschiede zeigen sich im EM bei 16.000-facher Vergrößerung in der Fettleber (rechts). Die Mitochondrien sind vergrößert und verzerrt. Bei einigen ist die Außenmembran und die Cristae zerissen (aus Lieber Ch. 1976).

So kann ein Teil, der nicht in Acetat umgewandelt wird, in die Blutbahn kommen, wobei das Acetaldehyd dabei in lockerer Bindung an die Erythrozyten geheftet ist und dann seine schädliche Wirkung ausübt.

So unterbindet Acetaldehyd z.B. die Proteinsynthese im Herzmuskel, wobei dieser Effekt teilweise die Tatsache erklären kann, daß durch übermäßigen Alkoholkonsum die Herzfunktion geschwächt wird.

Auch die durch Alkohol hervorgerufene Abhängigkeit b.z.w. Toleranz an Alkohol soll durch Acetaldehyd erklärt werden können, da sich das Acetaldehyd mit Neurotransmittern des Gehirns verbindet. Das führt dann zu Verbindungen, die in der Zusammensetzung bestimmten Morphinderivaten ähnlich sind, wobei bekannt ist, daß solche Derivate eine Abhängigkeit hervorrufen können (Lieber C. 1976).

Durch die konsequente Schwächung des Körpers mit Alkohol in großem Ausmaß wird auch das Immunsystem in seiner Abwehrfunktion herabgesetzt und die Leber derartig geschädigt, sodaß es zu Koma und Tod führen kann. Es gibt natürlich individuelle Unterschiede und nicht bei jedem führt stärkerer Alkoholkonsum gleich zu Hepatitis oder Leberzirrhose.

3. Methoden der Literatur zur Blutalkoholbestimmung

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Bestimmung der Alkoholkonzentration aufgezeigt worden. In der folgenden Übersicht bleibt die Alkoholbestimmung im nicht biologischen Material unberücksichtigt - es wird dabei nur auf die gängigen Methoden der Alkoholbestimmung von Blut b.z.w. Serum eingegangen.

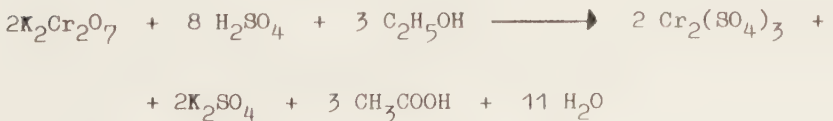
3.1. Widmark Methode

Die Methode von Widmark ist das klassische Verfahren der Alkoholbestimmung. Es entspricht einer Abänderung des von Nicloux (1896) veröffentlichten Bestimmungsverfahrens. Die Methode von Widmark (1932) benützt dabei die isotherme Destillation in einem abgeschlossenen Gefäß zur Abtrennung des Alkohols. Im verschlossenen "Widmark-Kölbchen" wird die Blutprobe auf 60° erwärmt und der darin enthaltene Alkohol in eine vorgegebene Menge (meist 1ml) Dichromat-schwefelsäure destilliert. Er reduziert dabei 6 - wertiges Chrom zu 3 - wertigem.

Je höher der Alkoholgehalt, desto geringer der Gehalt an Dichromat. Die gelbbraune Farbe der Dichromatlösung entfärbt sich in dem Maße wie Alkohol vorhanden ist.

Der Alkoholgehalt läßt sich dann mit Hilfe einer photometrischen Auswertungsmethode nach Grüner bestimmen.

Die Reaktion lautet folgendermaßen:



Da es sich bei der Widmark Methode um ein indirektes Reduktionsverfahren handelt, werden Stoffe, die ähnlich wie der Alkohol leicht oxidierbar sind, unter Umständen als solcher mitbestimmt. Es ist also ein alkohol- b.z.w. ethanolunspezifisches Verfahren, da alle flüchtig reduzierbaren Substanzen erfaßt und somit eine zu hohe Ethanolkonzentration gefunden werden kann.

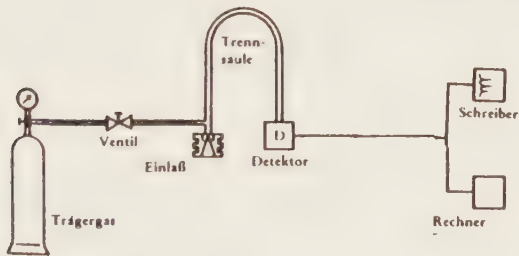
Nach Unterlagen von Krauland und Vidic (1964) an 400 Proben, zeigt das Widmarkverfahren eine durchschnittliche systematische Abweichung von $\pm 0,006$ ‰ und eine Varianz von $0,056$ ‰ und ist somit etwa doppelt so hoch wie die der Gaschromatographie.

3.2. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie (Machata 1962, Mebs et al. 1979) stellt ein wichtiges ethanol-spezifisches und weit verbreitetes Verfahren dar.

Bereits zu Beginn der 60er Jahre war die Gaschromatographie in vielen forensisch-toxikologischen Laboratorien zur Analyse der Arzneimittel in Körperflüssigkeiten eingesetzt worden.

Das Prinzip zeigt Abbildung 2:



Die sogenannte Trennsäule spielt dabei die wichtigste Rolle.

Sie ist mit einem Material gefüllt, das die Eigenschaft besitzt, verschiedene Stoffe unterschiedlich lange zu adsorbieren. Spritzt man nun am Anfang dieser Säule ein Alkoholgemisch ein und durchspült die Säule mit einem sogenannten Trägergas, so kommen die einzelnen Bestandteile des Gemisches am Endpunkt der Säule zu verschiedenen Zeiten an.

Es besteht also die Möglichkeit, Substanzgemische in ihre Bestandteile zu zerlegen, die nacheinander von einem geeigneten Anzeigengerät (Detektor) registriert und dann aufgeschrieben werden.

Die unterschiedliche Verweildauer der einzelnen Substanzen spiegelt sich dann als Gaschromatogramm wieder, das eine Reihe von nacheinander aufgezeichneten " Peaks " der entsprechenden Alkohole darstellt.

Die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung ist die spezifischste aller gängigen Methoden, da eine Abtrennung von anderen flüchtigen Substanzen mit verschiedener Retentionszeit erfolgt, wobei die Höhe oder Fläche des entsprechenden " Peaks " in Beziehung zur Substanzmenge gesetzt wird.

Machata (1962) versuchte die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens noch zu erhöhen, indem er nicht die Blutprobe selbst, sondern den Dampfraum über der Blutprobe untersuchte (deswegen wird sie auch Dampfraum oder Headspace Analyse bezeichnet).

Es wird 0,1-1 ml Blutprobe benötigt, die luftdicht bei 60°C erwärmt wird; nach 20 min stellt sich dann im Dampfraum über der Blutprobe ein Gleichgewicht ein.

Die Alkoholkonzentration in der Dampfphase ist dabei proportional der Alkoholkonzentration im Blut, ohne daß sich im Dampfraum die zahlreich störenden Inhaltsstoffe des Blutes (Eiweiß, Fette, Salze u.ä.) befinden.

Die Sicherheit der Methode wird meist dadurch erhöht, daß bei jeder Messung ein innerer Standard (z.B. t-Butyl - alkohol) mitgeführt wird und außerdem die Probenentnahme vollautomatisch erfolgt, sodaß ein genau abgemessenes Volumen des Dampfes angesaugt und dem Gaschromatographen zugeführt wird.

Zink (1985) untersuchte die Präzision der GC-Methode und stellte dabei einen relativen Fehler von 1,7% (bei 150 Proben) b.z.w. eine relative Standardabweichung von 1,9% (an 1300 Proben) fest.

3.3. ADH-Verfahren

Die Abkürzung ADH steht für die Alkoholdehydrogenase. Bei dem hier beschriebenen Verfahren, das Anfang der 50-iger Jahre in die Blutalkoholbestimmung eingeführt wurde, handelt es sich um eine Methode, die es ermöglichte, die Blutalkoholkonzentration mit Hilfe von Enzymen zu ermitteln.

Das ADH-Verfahren (Bonnichsen et al. 1951, Redetzki und Johannismeier 1952, Leithoff 1964, Grüner et al. 1974) beruht dabei auf biochemischen Vorgängen, die auch im Organismus bei Alkoholabbau ablaufen.

Es liegt dabei folgendes Prinzip zugrunde:

Ethanol wird in einer Reaktion, die durch das Enzym Alkoholdehydrogenase katalysiert wird, durch NAD^+ zu Acetaldehyd oxidiert.



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von Ethanol und NAD^+ . Es kann jedoch durch NAD^+ -Überschuß, alkalisches Milieu und Abfangen von Acetaldehyd mit Semicarbacid völlig auf die Seite von Acetaldehyd und NADH^+ verschoben werden.

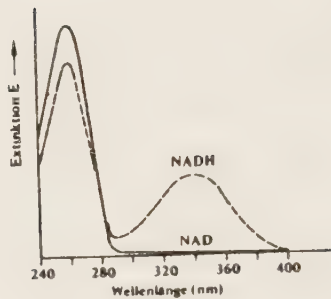
Die bei der Reaktion gebildete NADH^+ -Menge ist dabei der Ethanolmenge äquivalent, wobei NADH^+ die Meßgröße darstellt und durch photometrische Messung bei 366, 340 oder 334 nm leicht zu bestimmen ist.

Zur Messung eignet sich jedes lichtelektrische Spektralphotometer, welches Absorptionsmessungen im UV Bereich ermöglicht.

Die größte spezifische Extinktion wird entsprechend dem Absorptionsspektrum des NADH bei 340 nm erhalten (siehe Abbildung 3).

Abb.3

Zunahme
der Absorption
bei 340 nm
proportional
der dehydrierten
Alkoholmenge



Vergleich: Testlösungen mit bekannter Alkoholkonzentration

Hancock et al. (1971) berichteten, daß die enzymatische ADH - Methode extrem empfindlich sei, so müßte die Ethanolkonzentration nicht höher sein als 0,002%, um Alkohol zu erfassen, wobei aber die Laboratoriumsluft und das zur Herstellung der Lösung verwendete Wasser frei von Alkoholen und Aldehyden sein muß.

Die ADH-Methode gilt als weitgehend ethanol-spezifisch, obwohl auch einige andere Alkohole bei der Reaktion mit erfaßt werden und somit Kreuzreaktionen zustande kommen können.

Bei einer vergleichenden Messung (Keller 1979) aller kurz-kettigen einwertigen Alkohole von Methylalkohol bis zum tertiären Amylalkohol in einer Konzentration von jeweils 1 ‰, zeigte sich folgendes Resultat (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: (nach Keller 1979)

" Ethanolkonzentrationen" von kurzkettigen, einwertigen Alkoholen beim ADH-Verfahren.

(Konzentrationen der einzelnen Lösungen: 1^o/oo)

Alkohol	Auto-Analyser	ADH - manuell
Methylalkohol	0,00 ^o /oo	0,16 ^o /oo
Ethylalkohol	1,00 ^o /oo	1,00 ^o /oo
n-Propylalkohol	0,18 ^o /oo	0,91 ^o /oo
Isopropylalkohol	0,01 ^o /oo	0,46 ^o /oo
n-Butylalkohol	0,06 ^o /oo	0,78 ^o /oo
Isobutylalkohol	0,00 ^o /oo	0,15 ^o /oo
sek. Butylalkohol	0,00 ^o /oo	0,22 ^o /oo
tert. Butylalkohol	0,00 ^o /oo	0,14 ^o /oo
n-Amylalkohol	0,01 ^o /oo	0,70 ^o /oo
Isoamylalkohol	0,01 ^o /oo	0,13 ^o /oo
2-Methylbutanol - (1)	0,00 ^o /oo	0,19 ^o /oo
tert. Amylalkohol	0,00 ^o /oo	0,20 ^o /oo

Bei der Bestimmung durch das automatische ADH-Verfahren mit dem Autoanalyser bewirken neben dem Ethylalkohol nur n-Propylalkohol und n-Butylalkohol eine deutlich meßbare scheinbare Ethanolkonzentration von 0,18 ^o/oo b.z.w. 0,06 ^o/oo.

Beim manuellen ADH- Verfahren lagen dagegen die scheinbaren Ethanolkonzentrationen über 0,1 ^o/oo und erreichen z.B. bei n-Propylalkohol fast die vorgegebenen 1 ^o/oo.

3.3.1. Manuelles und automatisches ADH-Verfahren mit Endpunktbestimmung

Die von Bonnichsen und Theorell (1951) beschriebene Originalmethode des ADH-Verfahrens wurde von Bücher und Redetzki (1951) modifiziert.

Es handelt sich dabei um eine Methode, die auf der Messung des Reaktionsendwertes beruht, wobei eine vollständige Umsetzung des Ethanol durch ADH als NAD gekoppelte Reaktion erfolgt.

Dabei werden 0,5ml Blut oder Serum mit 2ml Perchlor - säure enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren (10 min/ bei 3000 U/min) erfolgt die Zugabe bei 0,1ml Überstand von 4,8ml Pyrophosphat Semicarbacidpuffer (ph 8,6) und 0,1ml NAD- Lösung.

Die Reaktion wird mit 0,02ml ADH-Lösung ausgelöst und nach 70 min Reaktionszeit bei 25°C die Extinktionszunahme gemessen.

Anhand einer Eichkurve wird dann die Alkoholkonzentration abgelesen.

Das Verfahren beruht auf der Messung des Reaktionsendwertes, der nach ca 70 min erreicht ist. Die geringe Empfindlichkeit des Orginalverfahrens von Bonnichsen und Theorell erklärt sich aus der Tatsache, daß nicht der Reaktionsendwert, sondern der Umsatz nach 30 min gemessen wird.

Die Eichkurve verläuft bei hohen Blutalkoholkonzentrationen häufig nicht ganz geradlinig (nur bis ca. 1,8 ‰), wenn nicht genügend NAD zugesetzt wird; der lineare Bereich kann deswegen durch Erhöhung der NAD-Konzentration erweitert werden.

Bei routinemäßiger Alkoholbestimmung wird auch nicht 2ml, wie nach dem ursprünglichen Verfahren von Bücher und Redetzki verwendet, sondern 4,0ml Perchlorsäure zur Enteiweißung von 0,5ml Blut eingesetzt, da alle praktisch

interessierenden Blutalkoholkonzentrationen direkt erfaßt werden und bis zu 3 ‰ im geradlinigen Bereich der Eichkurve liegen (Redetzki und Johannismeier 1955).

Im Rahmen der Notfalldiagnostik (Alkoholvergiftung) kann die Reaktionszeit bei der Blutanalyse von 70 min auf 25 min verkürzt werden, wenn man die Probe im Wasserbad bei 37°C (statt 25°C) inkubiert.

Leithoff (1964) gelang es die enzymatische Blutalkoholbestimmung zu automatisieren. Nach seinen Erfahrungen ist die Genauigkeit des automatischen Verfahrens mit dem Autoanalyser im Vergleich zur manuellen Methode gleichwertig b.z.w. überlegen, da gleich gute Ergebnisse in wesentlich kürzerer Zeit erzielt werden können. Sie ermöglicht unter besten Voraussetzungen 60 Analysen/h. Außerdem wird beim automatischen Verfahren die Befunderhebung objektiviert, da die Möglichkeit entfällt, daß individuelle Fehler bei den Vorgängen des Pipettierens oder Wägens der Messung entstehen können.

Nach Zink (1985) ergaben sich bei 150 achtfach Bestimmungen mit dem automatischen ADH-Verfahren relative Fehler der Einzelmessung von 2,02% und eine Standardabweichung von 2,7%.

Bei Leithoff (1965) zeigte sich an 200 Analysen die Standardabweichung von 0,005 für das automatische ADH-Verfahren und 0,017 für das manuelle ADH-Verfahren.

3.3.2. Verfahren zur Messung der Enzymkinetik der ADH

Es handelt sich hierbei um eine quantitative Bestimmung des Blutalkohols, bei der auf Grund der Absorptionsänderung innerhalb definierter Zeit die Blutalkoholkonzentration (BAK) errechnet wird.

Im Gegensatz zur üblichen Methode, bei der die Bestimmung der Substratkonzentration auf dem Reaktionsendwert in Gegenwart eines Enzymüberschusses beruht, erfolgt hier die Messung kinetisch, wobei die Umsatzrate des Enzyms den limitierenden Faktor darstellt.

Gegenüber dem automatischen ADH-Verfahren von Leithoff (1964) mit dem Auto-Analyser hat diese Methode von Brown et al. (1971) und Portman et al. (1980) den Vorteil, daß die Blutproben für die Analyse nicht enteiweißt zu werden brauchen, die Inkonstanz der Null - Linien - Findung wegfällt und der Reagentien- und Materialverbrauch geringer gehalten werden kann.

4. Die kinetische ADH-Bestimmung des Ethanols von Brown et al. (1971)

Im Folgenden wird eine Zusammenfassung des Originalverfahrens von Brown beschrieben.

Es handelt sich dabei um eine quantitative Bestimmung des Blutalkohols mit der ADH-Methode unter Verwendung eines Reaktion-Rate-Analysators (Firma LKB, Schweden).

Dieses Gerät registrierte bei 340 nm fortlaufend die NAD/NADH gekoppelte Enzymreaktion mit linearer Geschwindigkeit.

Bei der Methode mußten die Blutproben vorher nicht ent-eiweißt werden und außerdem hatte das Gerät den Vorteil, daß es durch seine hohe Empfindlichkeit nur sehr geringe Blutmengen für die Messungen benötigte.

Es wurde dabei folgendermaßen vorgegangen:

Die Blutprobe (10 µl) wurde mit 940 µl Wasser in einer Küvette verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden dann mit Pufferlösung (0,85 ml), die Semicarbacid und NAD enthielt, versetzt und auf 37°C im Thermostatiktunnel des Reaktion-Rate-Analysators erwärmt.

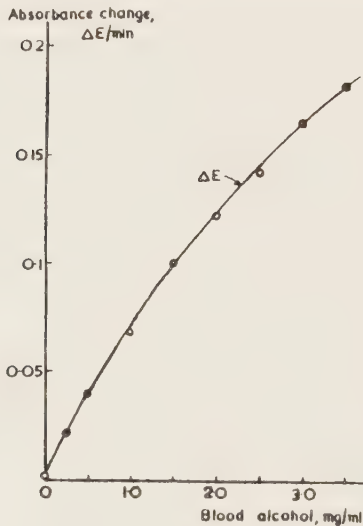
Durch die Zugabe von ADH (50 µl) wurde die Enzymreaktion gestartet, deren Verlauf - Anstieg der Extinktion bei 340 nm - registriert wurde.

Aus der Absorptionsänderung innerhalb einer Minute konnte die BAK in Gegenwart eines Enzymüberschusses errechnet werden.

Bei den Untersuchungen von Brown zeigte sich, daß die Eichkurve (Korrelation von Alkoholkonzentration zur Extinktion keine Gerade bildete, sondern bei höheren Konzentrationen allmählich abfiel (ab ca. 1,7 ‰) - siehe Abbildung 4.

Insgesamt zeigte die kinetische ADH-Methode von Brown eine gute Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung mit gaschromatographischen Vergleichsuntersuchungen;

Abb. 4: Eichkurve von Brown et al 1971



Portman (1980) übernahm die Methode von Brown in vielen Bedingungen, änderte aber die Verdünnungen. So benötigte er in seiner Methode 20 μl Blut, das dann mit 1000 μl destilliertem Wasser verdünnt wurde. Danach wurden 50 μl dieser Verdünnung entnommen und mit 1000 μl NAD-Pufferlösung versetzt. Auch in der automatischen ADH-Zugabe mit 100 μl bei Portman unterschied sich diese Methode von der Originalmethode.

Es wurden außerdem geringfügige Verbesserungen an der Thermostatkörhre des Gerätes vorgenommen, wobei durch eine Abdeckplatte eine Verdunstung b.z.w. ein Verschleppen des Probenmaterials verhindert werden konnte.

Es zeigte sich auch, daß eine gute Präzision und Korrelation zu anderen Methoden auch bei dieser Methode sich

ergab.

Die folgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen Versuchsbedingungen der beiden kinetischen ADH-Methoden noch einmal auf.

Tabelle 2: Vergleich der kinetischen ADH-Methode von Brown und Portman

Autor	absolute Verdün - nung	1. Verdünnung Blut/dest. H ₂ O	2. Verdünnung Erstverdün - nung/ NAD - Puffer	ADH - Menge
Brown	1: 950	10µl/ 940µl	100µl/ 850µl	50µl
Portman	1:1071	20µl/1000µl	50µl/1000µl	100µl

5. Eigene Untersuchungen

In dieser Arbeit sollte ein brauchbarer Ansatz zur quantitativen Bestimmung von Blutalkohol mittels des Reaktion Rate Analysators erarbeitet werden.

Es wurde in der folgenden Arbeit von den Versuchsbedingungen, die Brown (1971) und Portman (1980) verwendet hatten, ausgegangen. Im Laufe der Versuche zeigte es sich, daß einige Versuchsschritte modifiziert werden mußten, um zufriedenstellende Ergebnisse zu erreichen.

Es sollte sich auch an Hand der Versuche zeigen, ob Vollblut verwendet werden kann und inwieweit sich Unterschiede in der Untersuchung von Alkoholstandardlösungen und Blutproben ergeben würden.

5.1. Versuchsdurchführung

5.1.1. Methodik

Bei den folgenden Untersuchungen wurden die zu untersuchenden Alkoholproben mittels eines Ultralab. Diluters (LKB Bromma 2075) entnommen. Dieses Gerät - bestehend aus zwei Pumpsystemen - das zum Verdünnen und Dosieren von Flüssigkeiten gedacht ist, wurde im 1. Arbeitsschritt dazu verwendet, daß die Alkoholprobe angesaugt und mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

Ein Teil dieses Gemisches wird dann im 2. Verdünnungsschritt mit NAD-Pufferlösung direkt in Halbmikro - Einweg Küvetten aus Acrylamid gespült.

Jeweils 10 dieser Küvetten sind in einem Meßgestell untergebracht, wobei mehrerer dieser Küvettengestelle mit

fortlaufender Nummerierung auf ein Transport Tablett des Reaktion Rate Analysators 8600 LKB (modifiziert auf 2086 LKB) aufgestellt sind und anschließend schrittweise durch einen Thermostattunnel bei 37⁰C geschoben werden.

Der Analysator besteht hauptsächlich aus einem Spektralphotometer, mit einem Filter der Wellenlänge von 340 nm.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min im Tunnel erreicht die erste Probe, die alle Komponenten außer dem Schlüsselreagenz ADH beinhaltet, die Meßposition.

Dort erfolgt die automatische Zugabe eines vorgegebenen Volumens der ADH-Lösung und nach einer Vermischung der Reaktionsflüssigkeit innerhalb von 2,5 sec wird bei 340 nm gemessen

Am Ende der vorgegebenen Zeit bringt das Meßgestell die nächste Probe in den Lichtstrahl und es wiederholt sich der Zyklus von neuem.

Der gemessene Extinktionswert wird von einem Tischcomputer (LKB 2082 - 075) erfaßt und als ⁰/oo BAK ausge - drückt.

Vorher ist der Rechner für 10 Konzentrationsstandardwerte (von 0-3 ⁰/oo) einschließlich Meßzeit und Korrelationsfaktor programmiert worden.

Das Programm, festgelegt für Analysen mit "Fixed Time Kinetik", mißt dabei die Extinktion an zwei in den Analysen vorbereiteten, willkürlich festgelegten, konstanten Meßzeitpunkten.

Die Extinktionsänderung über diese Zeitspanne hinweg stellt die Basis für die Auswertung als Zweipunkt Kinetik dar.

Die Ergebnisse werden an Hand einer Standarddeichkurve ausgewertet, die das Programm mit linearer oder parabolischer Regression aus den Standardmesspunkten ermittelt.

Das Programm benutzt zur Berechnung der Eichkurve die allgemeine Formel:

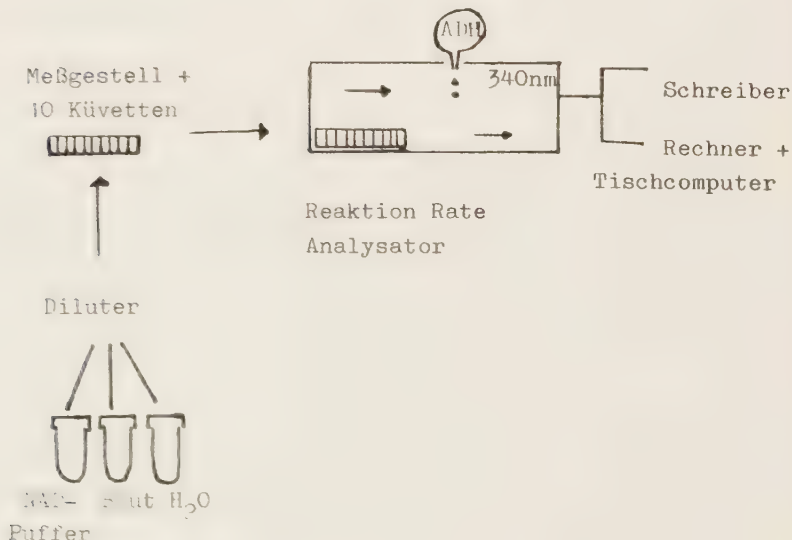
$$\text{Konzentration} = A (\Delta E)^2 + B(\Delta E) + C$$

B ist dabei die Steigung der Kurve, d.h. das Verhältnis von Konzentration zu Extinktion.

C bedeutet den Abschnitt auf der Y-Achse, d.h. den Leerwert.

Abbildung 5 zeigt eine grob schematisierte Darstellung der Versuchsanordnung, wobei die verwendeten Geräte in der nacheinander geordneten Reihenfolge aufgeführt sind.

Abb.5



5.1.2. Reagentien

Die Firma Boehringer Mannheim bietet eine Alkoholtest-Kombination an, die für die ADH-Endpunktmethode bestimmt ist. Diese angebotenen Kits wurden für die Enzymkinetik der ADH modifiziert und in folgender Weise verwendet (1,2 und 3 stammen aus der Alkoholtest Kombination):

Reagentien:

1. Pyrophosphatpuffer 75 mol/l, ph 8,7; Semicarbacid 75 mmol/l; Glycin 21 mmol/l.
2. NAD 24 mmol/l
3. ADH der Hefe $\geq$ 8000 U/ml
4. Ethanolstandardlösungen der Firma Merck als 10er Ampullenpackung mit 0,5-3,0 mg/ml (= ‰)

Herstellung der Lösungen:

- I. Der unter 1. angegebene Pyrophosphatpuffer wird mit 150 ml destilliertem Wasser gelöst und stellt Lösung 1 dar. Haltbarkeit bei +2-8°C bis zu 3 Wochen.
- II. Weiterhin wird das Fläschchen 2 mit NAD-Enzym mit 3ml destilliertem Wasser aufgefüllt und stellt somit die Lösung 2 dar. Haltbarkeit bei +2-8°C ca. 4 Wochen. Diese beiden Flüssigkeiten werden täglich frisch gemischt im Verhältnis 50 ml Lösung 1/ 1ml Lösung 2. Dieses Gemisch ist die NAD-Pufferlösung.
- III. Das ADH-Enzym wird jeden Tag neu in 40 ml destilliertem Wasser gelöst. Danach wird es dann für

ca 1 ¹/₂ h an einem Ort aufbewahrt, der nicht dem direkten Lichteinfall ausgesetzt ist. Damit kann die optimale Enzymtätigkeit sich in dem angegebenen Zeitraum entfalten, ohne daß die Lösung der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist.

5.2. Bestimmung des Verdünnungsverhältnisses an Alkoholstandards

An rund 50 Versuchsreihen wurden nun einige Untersuchungen mit Alkoholproben der Fa. Merck angestellt, wobei verschiedene Verdünnungen erprobt wurden (Tabelle 3).

Es wurde zuerst darauf geachtet, in der Größenordnung des von Brown (1971) b.z.w. Portman (1980) angegebenen Verdünnungsverhältnisses zu liegen.

Eine Reihe von Versuchsansätzen wurde deswegen mit der Erstverdünnung 15 μ l Alkoholprobe/ 750 μ l dest. Wasser durchgeführt, da die absolute Verdünnung somit 1:900 entspricht, wenn die 2. Verdünnung gleichzeitig mit 25 μ l Erstverdünnung/ 450 μ l NAD-Puffer gewählt wird.

Im Anschluß an diese Versuche wurden dann noch die Verdünnungen 50 μ l/750 μ l; 50 μ l/900 μ l und 25 μ l/900 μ l (jeweils Alkoholprobe/ dest. Wasser) erprobt - siehe auch Tabelle 3.

Tab.3: Unterschiedliche Verdünnungsansätze

1.Verdünnung Alkoholprobe/ Wasser (μ l)	2.Verdünnung Erstverdünnung/ NAD-Puffer (μ l)	absolute Verdünnung	ADH - Menge (μ l)
15/750	25/450	1:900	25,75
50/750	25/450	1:270	75
50/900	25/450	1:324	100
25/900	25/450	1:648	75

Die zweite Verdünnung mit NAD-Puffer blieb bei den Versuchen konstant (25 μ l Erstverdünnung/ 450 μ l NAD-Pufferlösung).

Im Originalverfahren von Brown wurde die Zweitverdünnung 100 μ l/850 μ l b.z.w. bei Portman 50 μ l/ 1000 μ l verwendet.

Weiterhin wurde der Einfluß unterschiedlicher ADH-Mengen (von 25-100 μ l) untersucht.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 6 dargestellt.

Abb.6:

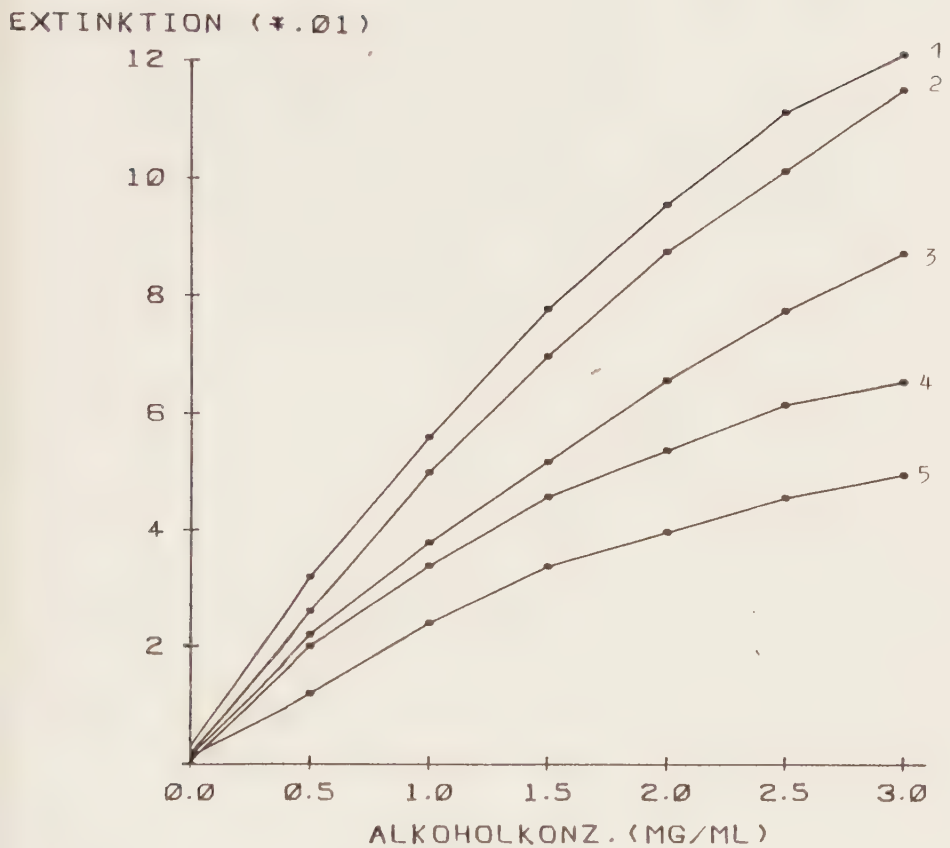


Abb.6 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion von der Alkoholkonzentration, wobei unterschiedliche Erstverdünnungen der Alkoholprobe und deren dazugehörige ADH-Mengen zugabe gegeben sind. Die Zweitverdünnung ist überall 25 μ l Erstverdünnung/ 450 μ l NAD-Puffer.

Kurve 1: 15 μ l Alkoholprobe/750 μ l dest. H_2O ; 25 μ l ADH

Kurve 2: 25 μ l " /900 μ l " ; 75 μ l ADH

Kurve 3: 15 μ l " /750 μ l " ; 75 μ l ADH

Kurve 4: 50 μ l " /750 μ l " ; 75 μ l ADH

Kurve 5: 50 μ l " /900 μ l " ; 100 μ l ADH

Wie man aus den Graphiken erkennen kann, ergeben sich Unterschiede in den Steigungen, abhängig von der Verdünnung b.z.w. der ADH-Lösungsmenge.

Es wurde schon erwähnt, daß eine Reihe von Versuchsansätzen mit der Vorverdünnung von $15\mu\text{l}/750\mu\text{l}$ durchgeführt wurde, bis sich dann herausstellte, daß auch andere Verdünnungen wie z. B. $25\mu\text{l}/900\mu\text{l}$ ein gutes Ergebnis in Bezug auf die Spannbreite der Extinktion bei den einzelnen Alkoholmengen erzielen konnte.

Unklar war zu dem Versuchszeitpunkt noch, ob die Zugabe der verschieden hoch dosierten ADH-Mengen oder das Verdünnungsverhältnis eine bedeutendere Rolle in der Unterschiedlichkeit der Kurven spielte.

Da aber bei der geringen ADH-Zugabe von $25\mu\text{l}$ der Dosierfehler eine erhebliche Rolle spielt - wie sich erst später herausstellte - , wurde auf Grund der Graphik mit $75\mu\text{l}$ ADH-Lösung experimentiert und das Verdünnungsverhältnis auf $25\mu\text{l}$ Alkoholprobe/ $900\mu\text{l}$ dest. Wasser festgelegt.

So ist trotz dieser an sich nicht ganz befriedigenden Situation, vorerst auf Grund der Graphik, die Versuchsbedingung von Kurve 2 (Abb.6) übernommen worden.

Man sieht weiterhin aus der Abbildung, daß die Funktion der Ethanolkonzentration zur Extinktion nicht linear ist, sondern sich ab ca $1,5\text{ ‰}$ eine leichte Abflachung bei allen Kurven zeigt.

Auch Portman et al. (1980) und Brown (1971) erwähnten dies bei ihren Experimenten, wobei für die Standard Eichkurve (s. a. Abb.4) ein polynomies Kurvenprogramm erstellt werden mußte.

Redetzki (1956) erklärte diesen Sachverhalt dadurch, daß dieser Effekt auf eine Verringerung der NAD-Reserven beruht, wobei der lineare Bereich der Eichkurve durch eine Erhöhung der NAD-Konzentration erweitert werden könnte.

Auch bei Schmidt und Schulz (1963), die Fehler und Streuungen des ADH-Verfahrens aufzeichneten, ergab sich eine Abhängigkeit der NAD-Konzentration bei der Aufstellung der Eichkurven.

Es wurde festgestellt, daß die Kurve nur bis 2,4 ‰ geradlinig verläuft (bei Zugabe von 0,1 ml der üblichen 13 mg NAD/ccm Lösung) und selbst bei Zugaben von höheren NAD-Lösungen von 0,3 ml würde ein stöchiometrischer Umsatz nicht erreicht werden.

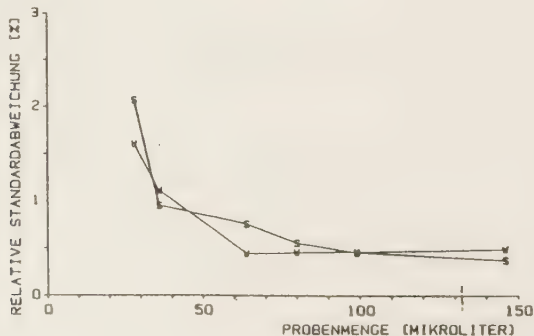
5.3. Bestimmung der ADH-Menge

Es wurde schon erwähnt, daß es sich als ungünstig erwies, mit geringen Mengen (25-50 μ l) ADH beim Reaktion Rate Analysator zu arbeiten, weil ein gewisser Unsicherheitsfaktor bei der Meßgenauigkeit der Pumpenvorrichtung mitspielt.

Zink (1985) erkannte diese Schwierigkeit der Dosiergenauigkeit bei geringen Mengen auch in seinen Untersuchungen. Die Angaben beziehen sich allerdings auf die mechanische Dosiereinheit Dilumatik, wobei die Streuung im Bereich der eben noch einstellbaren Mengen unter 40 μ l erkennbar ansteigt (siehe Abbildung 7).

Abb.7: (aus Zink 1985)

Abhängigkeit der relativen Standardabweichung von der eingesetzten Probenmenge bei Einzeldosierung mit der Dilumatik (Braun). Die mit W gekennzeichneten Kurven wurden an Zwei-Promille-Ethanol-Wasser-Mischungen gemessen, die mit S gekennzeichneten Kurven an Serum mit ca 2 Promille Ethanol. Jeder Punkt entspricht dem Mittel aus mindestens 25 Einzelmessungen.

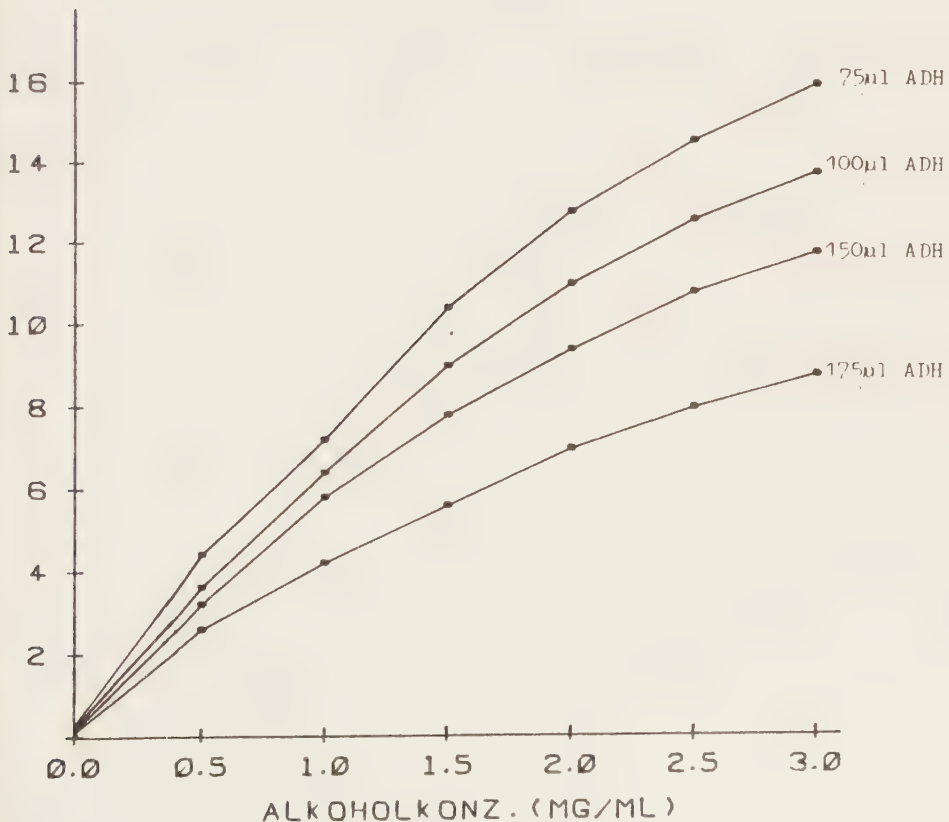


Aus diesem Grunde wurden mehrere Versuchsansätze mit ADH-Mengen von 75-175 μ l durchgeführt (siehe Abb. 8). Alle Alkoholtestlösungen der Fa. Merck sind dabei jetzt mit der Erstverdünnung von 25 μ l Alkoholprobe/900 μ l dest. Wasser und der Zweitverdünnung von 25 μ l Erstverdünnung/450 μ l NAD-Puffer angesetzt worden.

Abb.8:

In Abhängigkeit der ADH-Mengen (75-175 μ l) ergeben sich unterschiedliche Eichkurven.

EXTINKTION (*0.01)



Man erkennt wieder beträchtliche Abweichungen bei verschieden hoch dosierten ADH-Zugaben. Aus der Graphik läßt sich erkennen, daß bei höheren ADH-Werten die Extinktionen niedriger bleiben, als bei vergleichbar geringerer Menge an ADH.

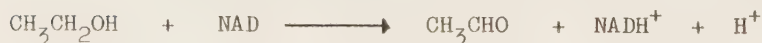
Es zeigte sich somit, daß ADH-Mengen über 75 μ l keine Verbesserung, sondern eine deutliche Verschlechterung für die Steigung der Eichkurven bedeutete.

Erklärbar wäre dieses verblüffende Resultat durch die von Hayes und Velick gefundenen Ergebnisse.

Hayes J.E. und Velick S. (1953) beobachteten nämlich, daß der Wert der Gleichgewichtskonstanten K sehr stark anstieg (von $1,08 \cdot 10^{11}$ auf $10,2 \cdot 10^{11} \triangleq$ fast dem zehnfachen), wenn die Konzentration von ADH von sehr geringen Werten ($0,12 \cdot 10^6$ Mol/l) auf Werte von $39,7 \cdot 10^6$ Mol/l erhöht wurde.

Dabei ist die Gleichgewichtskonstante folgendermaßen definiert:

$$K = \frac{\text{NADH}^+ \cdot \text{CH}_3\text{CHO}}{\text{NAD} \cdot \text{CH}_3\text{CHOH}} \quad \text{nach der Reaktion}$$



Bei jenen Untersuchungen blieben die initialen NADP-Konzentrationen konstant, während die Ethanol- und Enzymkonzentrationen variiert wurden.

Hayes und Velick entnahmen aus ihren Ergebnissen:

1. daß die Dissoziationskonstante des ADH - NADH Komplexes ungefähr 1/10 des ADH-NAD Komplexes bildet und bei sehr hohen ADH-Enzymkonzentrationen das Maximum der Gleichgewichtskonstanten nicht erreicht wurde.

2. daß weiterhin die Anzahl der Bindungsstellen (4 pro Molekül ADH) überhaupt nicht mit der Konzentration der gebildeten NADH Menge übereinstimmte.

Aus diesen Fakten wurde geschlossen, daß Acetaldehyd, bei der Reaktion gebildet wird, sich an ADH bindet, so daß es zu einem Intermediärprodukt Acetaldehyd-ADH kommt, das bei sehr hohen ADH-Konzentrationen die Gleichgewichtskonstante ansteigen läßt; dadurch sinkt die NADH Konzentration, welche die Meßgröße darstellt und bei 340 nm im Spektralphotometer registriert wird.

Die graphisch dargestellten Ergebnisse der Abbildung 8 könnten durch die Resultate von Hayes und Velick erklärt werden, wonach eine erhöhte ADH-Konzentration nicht unbedingt mit einem Ansteigen der NADH-Konzentration (und damit höheren Extinktionswerten) korreliert ist.

Es zeigte sich auch im Laufe der Untersuchungen, daß das exakte Ansetzen der ADH-Lösung eine bedeutende Rolle spielt, um eine gute Extinktionskurve zu erhalten. Dabei ist nicht nur die genaue Abmessung des dest. Wassers wichtig, sondern vor allem die Wartezeit zwischen Mischen des ADH-Enzyms bis zur endgültigen Verwendung im Reaktion Rate Analysator.

Einige Versuchsreihen wurden angesetzt um diese Vermutung, daß die Wartezeit eine so wichtige Rolle spielt, zu bekräftigen. So schwankte die Zeitspanne zwischen Auflösung des Enzyms und der Verwendung als Schlüsselreagenz für die Reaktion von 15 min bis 90 min (siehe Abbildung 9 und Tabelle 4).

Nach ca $1\frac{1}{2}$ h zeigte sich, daß die volle Aktivität des ADH-Enzyms erreicht war, da bei mehreren Versuchsansätzen nur noch mit minimalen Schwankungen zu rechnen war.

Außerdem wurde festgestellt, daß die besten Ergebnisse mit täglich frisch angesetzten ADH-Lösungen erzielt werden konnten, da mit einem Verlust der Enzymaktivität bei Raumtemperatur zu rechnen ist.

Abb.9: zeigt das Ergebnis von unterschiedlich langer Wartezeit (15min - 90min) zwischen Auflösung des ADH-Enzyms und Verwendung als Startreagenz.

EXTINKTION (*0.01)

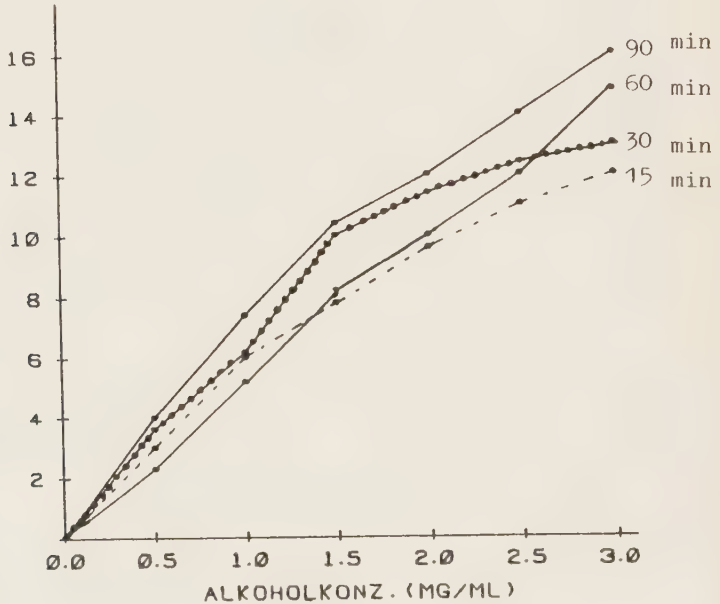


Tabelle 4:

Alkoholkonzentration (°/oo)	0,5	1,0	1,5	3,0
Extinktion nach 15min	0,023	0,050	0,086	0,121
Extinktion nach 30min	0,029	0,057	0,106	0,132
Extinktion nach 60min	0,038	0,062	0,079	0,151
Extinktion nach 90min	0,040	0,075	0,105	0,163

Nach Boehringer Mannheim liegt die Haltbarkeit der Enzymlösung nur bei einer Woche, wenn die Lösung bei Temperaturen von 2-8°C aufbewahrt wird.

Auch Hayes et al. (1953) beobachteten diesen Sachverhalt (bis zu 15% Aktivitätsverlust/h) im Laufe ihrer Untersuchungen.

Sie vermuteten, daß die Abnahme der Enzymaktivität linear mit der Zeit einhergeht und um ihre Ergebnisse sicherzustellen, ließen sie deswegen jeweils Kontrollproben am Ende der Versuchsserien mitlaufen.

5.4. Bestimmung der Meßzeit

Sowohl bei Portman (1980) als auch bei Brown (1971) wurde die Meßzeit auf eine Minute festgelegt, wobei die Registrierung der Absorptionsänderung ohne sogenannte delay-time, d.h. sofort nach der Vermischung der ADH-Lösung erfolgte.

Es sollte sich nun bei den folgenden Untersuchungen zeigen, ob man durch eine Verkürzung der Meßzeit auf 40sec b.z.w. 30 sec ähnliche oder sogar bessere Resultate in den Extinktionswerten erzielen konnte.

Da die Basis für den Rechner die Auswertung der "Zweipunkt-Kinetik" ist, mußten 2 neue Rechenprogramme eingespeichert werden.

Es wurde nun die Absorptionsänderung gemessen, deren Verlauf durch den Anstieg der Extinktion nach 30sec b.z.w. 40 und 60 sec gegeben war.

Das Versuchsergebnis zeigt Tabelle 5 und Abbildung 10.

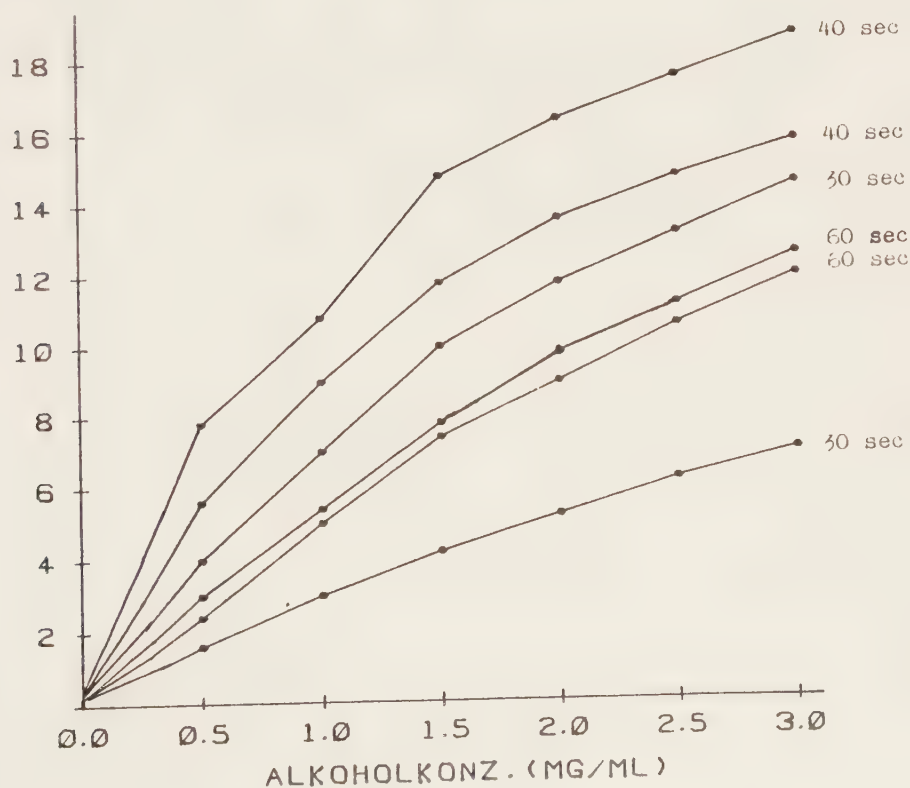
Tabelle 5 :

Alkoholkonzentration (°/oo)		0,5	1,0	1,5	3,0
Meßzeit; 30sec	Extinktion min; $\cdot 10^{-2}$	1,8	3,0	4,2	7,0
	max	4,2	7,6	9,8	13,8
	Variationskoeffizient (%)	56	61	56	46
Meßzeit; 40sec	Extinktion min; $\cdot 10^{-2}$	6,0	9,4	11,8	16,0
	max	8,4	12,0	14,8	18,4
	variationskoeffizient (%)	26	17	16	18
Meßzeit; 60sec	Extinktion min; $\cdot 10^{-2}$	3,1	5,5	7,6	12,2
	max	3,3	5,8	7,9	12,7
	Variationskoeffizient (%)	4	3,2	2,7	2,8

Abb. 10:

Die Beziehung der Extinktion zur Alkoholkonzentration bei verschiedenen Meßzeiten mit dem Reaktion Rate Analysator. Die Streuung ist durch zwei Meßkurven für eine Meßzeit deutlich, wobei die höchsten b.z.w. niedrigsten Wertepaare einer Meßzeit aus einer Versuchsserie ausgewählt worden sind.

EXTINKTION (*0.01)



Die verschieden hohen Extinktionswerte bei ein und derselben Meßzeit ergeben sich folgendermaßen:

Es wurden 3 Versuchsreihen mit der jeweiligen Meßzeit von 30, 40 und 60 sec durchgeführt.

Danach sind die Versuchsreihen mit den niedrigsten b.z.w. höchsten Extinktionswerten einer Meßzeit erfaßt worden.

Diese Werte einer Versuchsreihe wurden dann als Kurve verbunden und als Versuchsergebnis in Abb. 40 dargestellt.

Man erkennt, daß sich bei niedrigen Meßwerten (30 sec, 40 sec) eine große Variationsbreite ergeben hat.

Dies drückt sich auch in den mittleren Variationskoeffizienten der Meßwerte aus, wobei bei 30 sec ein $\overline{VK} = 54,7\%$ und bei 40 sec ein mittlerer $\overline{VK} = 17,8$ errechnet wurde.

Bei einer Minute Meßzeit ergaben sich zwar Schwankungen ($\overline{VK} = 3,3\%$), aber die Unterschiede waren so gering, daß man davon ausgehen konnte, daß bei 60 sec Meßzeit eine konstante Eichkurve sich ergeben würde.

Aus diesem Grunde wird die Meßzeit von 60 sec auch für die weiteren Versuche beibehalten.

5.4. Erstellung der Eichkurve mit bestimmten Alkoholstandards

Für die Bestimmung des Promillewertes im Blut spielt die Eichkurve, die mit Alkoholstandardlösungen aufgestellt wird eine ausschlaggebende Rolle.

Aus diesem Grunde wurden verschiedene Alkoholkonzentrationen in Serien zusammengestellt und dann die bestmögliche Standardkurve ausgewählt, die sich dadurch auszeichnete, daß sie große Extinktionsunterschiede bei niedrigen b.z.w. hohen Ethanolkonzentrationen darstellte.

Der Tischcomputer wurde dafür mit verschiedenen Programmen gespeichert, wobei folgende 10 Alkoholkonzentrationen (Tabelle 6, Abbildung 11) als Stützpunkte im Programm vorgegeben waren.

Die Abfolge der 10 nacheinander geordneten Zahlen ist dabei gleichzeitig identisch mit den Alkoholstandardlösungen, die durch nacheinanderfolgende Eingabe der Küvetten in den Analysator eingeschleust wurden.

Tabelle 6 :

	Alkoholkonzentrationen in Promille
Programm 1:	0; 0,5; 0,5; 0,5; 1,0; 1,0; 1,5; 1,5; 3,0; 3,0;
Programm 2:	0; 0,5; 0,8; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0; 2,4; 3,0; 3,0;
Programm 3:	0; 0,5; 1,0; 1,5; 1,8; 2,0; 2,2; 2,6; 2,8; 3,0;
Programm 4:	0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 1,7; 2,0; 2,4; 3,0;
Programm 5:	0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 1,9; 2,0; 2,4; 3,0;
Programm 6:	0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 2,0; 2,4; 3,0; 3,0;

Abb.11: Die Programme 1-6 wurden dem Tischcomputer eingegeben, wobei in jedem Programm jeweils 10 Alkoholwerte entweder als Doppelbestimmung (wie z.B. bei Nr. 1,6), oder als Einzelbestimmung festgelegt waren.

Alkohol- konzentration (‰)	Programmnummern					
	1	2	3	4	5	6
0	● ●	●	●	●	●	●
0,5	● ●	●	●	●	●	●
0,8		●		●	●	●
1,0	● ●					
1,3						
1,5	● ●	●	●	●	●	●
1,7		●		●	●	
1,8			●			
2,0		●	●	●	●	●
2,2			●			
2,4		●		●	●	●
2,6			●			
2,8			●			
3,0	● ● ● ●	●	●	●	●	●

Es zeigte sich bei der Wiederauffindung der Alkoholstandardlösungen folgendes:

1. Die "Schwachpunkte" der Eichkurve (zusammengesetzt aus den Extinktionswerten der Standardlösungen) waren vor allem im unteren Bereich bis ca. 1,3 mg Alkohol/ml, da dort die größten Unterschiede in den Extinktionen auftraten.
2. Bei 3⁰/oo traten sehr häufig große Extinktionsunterschiede auf (VK = 10,7%), sodaß die Eichkurve gerade dort starken Schwankungen unterlegen war.

Am günstigsten war es also, den unteren Bereich mit niedriger Alkoholkonzentration mit möglichst vielen vorgegebenen Standardlösungen abzudecken um damit eine gute Korrelation zwischen Extinktion und Alkoholkonzentration zu erreichen.

Es kommen für diesen Zweck nur die Programme 4-6 in Frage (siehe Abb.8).

In der deutschen Rechtssprechung ist derzeit der Gefahrengrenzwert für Alkohol am Steuer bei 0,8 ‰ festgelegt und bei 1,3 ‰ wird die absolute Fahruntüchtigkeit angenommen, sodaß für forensische Zwecke der Bereich zwischen 0 - 1,5 ‰ eine entscheidende Rolle spielt und die Eichkurve mit möglichst vielen Stützstellen versehen sein sollte.

Für die weiteren Versuche fiel die Entscheidung der Programmauswahl auf die Nr.6, da dort der Wert für 3 Promille als Doppelbestimmung vorgegeben war und sich größere Schwankungen in den Extinktionswerten durch eine zweifache Vorgabe des Wertes nivellieren lassen.

Weiterhin sprach noch ein wirtschaftlicher Grund für die Alkoholstandardwerte von Programm Nr.6.

Für die Aufstellung der Eichkurve werden Ampullen mit Alkoholstandardlösungen der Fa. Merck benutzt.

Diese werden entweder als Kombipackung mit vorgegebenen Alkoholwerten verschiedener Konzentrationen angeboten,

oder aber als 10er Ampullenpackung für bestimmte Alkoholkonzentrationen.

Diese entsprechen den Standardwerten, die im Programm Nr.6 vorgegeben sind.

6. Empirisch gefundene Versuchsanordnungen an Hand von Alkoholstandardlösungen

Es können nun auf Grund der bis jetzt gewonnenen Ergebnisse an Alkoholstandardlösungen die folgenden 4 Versuchsbedingungen aufgestellt werden:

- I. Verdünnung 1: 25 μ l/ 900 μ l (Alkoholprobe/ dest. H₂O)
Verdünnung 2: 25 μ l/ 450 μ l (1. Verdünnung/NAD-Puffer)
- II. ADH-Zugabe : 75 μ l
- III. Meßzeit : 60 sec
- IV. Die Eichkurve wurde mit den nachfolgenden Standardlösungen aufgestellt:
0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,3; 1,5; 2,0; 2,4; 3,0; 3,0;

Die Einführung einer neuen Methode macht es erforderlich, dieses Verfahren auf seine Zuverlässigkeit zu prüfen, d.h. es muß gesichert sein, daß der bestimmte Wert auch tatsächlich einer wahren Konzentration mit einer statistisch festgelegten Genauigkeit entspricht.

Zur Prüfung wurden daher wässrige Alkoholstandardlösungen der Fa. Merck nach der bereits geeichten und programmierten Meßmethode bestimmt.

Das Ergebnis zeigen Abbildung 12 und Tabelle 7.

Abb.12:

Relation zwischen vorgegebener und gemessener Alkohol-
konzentration bei wässrigen Alkoholtestlösungen.

GEMESSENE ALK.kONZ.

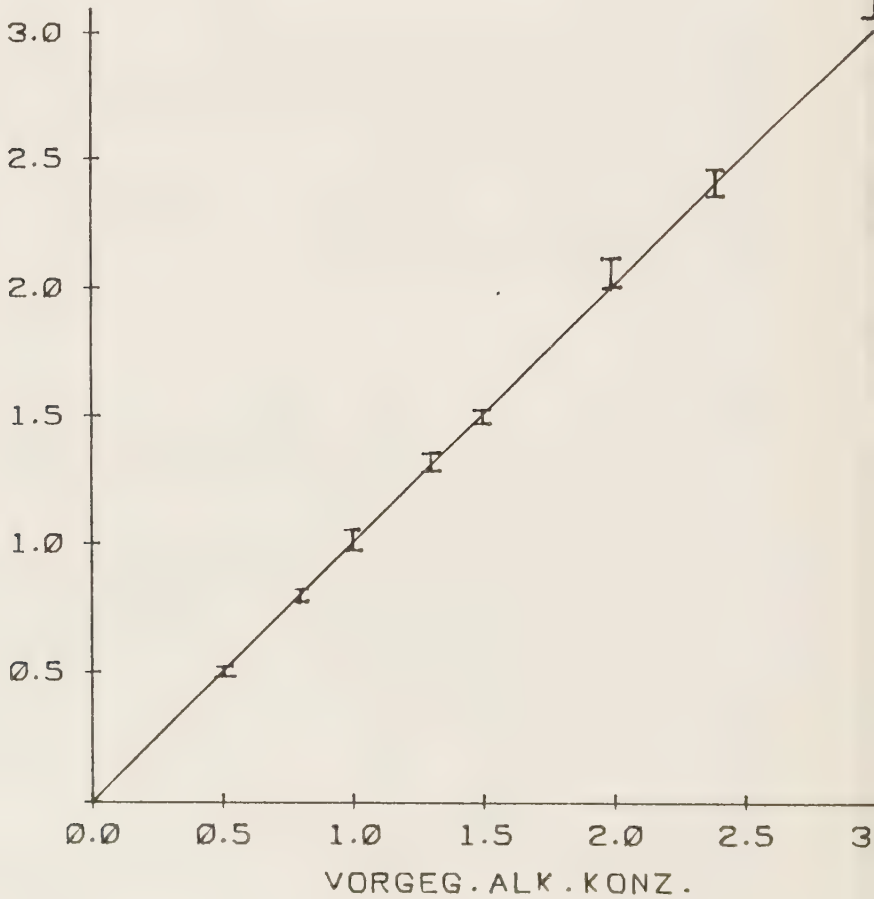


Tabelle 7:

Alkohol- konzentration (‰)	0,5	0,8	1,0	1,3	1,5	2,0	2,4	3,0
Serie 1 (‰)	0,52	0,81	0,99	1,35	1,47	2,11	2,42	3,09
Serie 2 (‰)	0,48	0,77	1,05	1,28	1,52	2,00	2,35	3,21
Serie 3 (‰)	0,51	0,82	0,98	1,32	1,51	2,05	2,45	3,05
Variationsko- effizient (%)	4,1	3,3	3,7	2,6	1,7	3,4	2,1	2,6
VK-2,93								
Mittelwert $\bar{x}$	0,5	0,8	1,00	1,32	1,5	2,03	2,41	3,12

Wie die Abbildung 12 und die Tabelle 7 zeigen, werden die im Computer vorgegebenen Eichwerte mit zufriedenstellender Zuverlässigkeit ($VK = 2,93\%$) an Alkoholstandardlösungen wiedergefunden.

7.1. Resultate der Blut- und Serumalkoholbestimmungen

Da die Ergebnisse an wässrigen Testalkohollösungen zufriedenstellend ausfielen, wurden nun sämtliche Prüfungen an Blut- und Serumalkoholproben mit den gefundenen Versuchsanordnungen (S. 43) durchgeführt, wobei jeweils 25 μ l Blut oder Serum zur Bestimmung verwendet wurden.

Über 90 derartiger Proben sind auf ihren Alkoholgehalt untersucht worden, deren Ethanolwerte zwischen 0,53-3,11 ‰ schwankten.

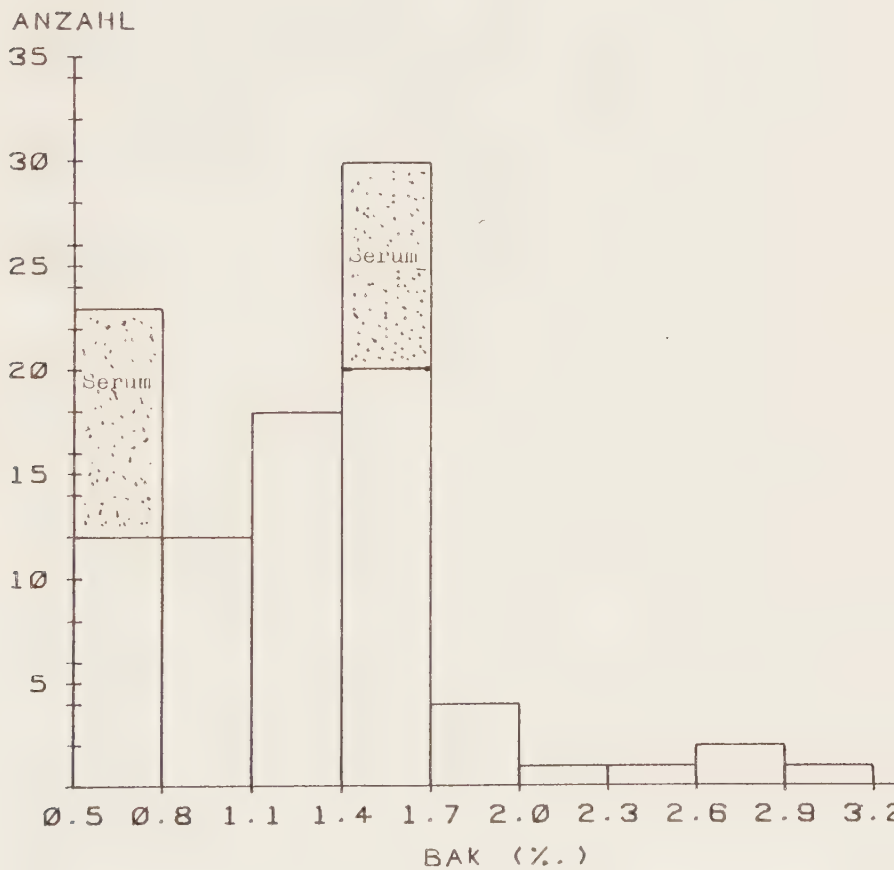
Abbildung 13 und Tabelle 8 zeigen die Häufigkeiten der Blut- und Serumalkoholproben in Abhängigkeit von den jeweils vorgegebenen Konzentrationsbereichen.

Tabelle 8:

Alkoholkonzentrations- bereiche in ‰ für Blut- und Serumproben	Häufigkeiten absolut	Spannweite der Differenzen in ‰
0,5 - 0,8	23	0,01 - 0,07
0,8 - 1,1	12	0,02 - 0,09
1,1 - 1,4	18	0,0 - 0,1
1,4 - 1,7	30	0,0 - 0,12
1,7 - 2,0	4	0,04 - 0,12
2,0 - 2,3	1	0,11
2,3 - 2,6	1	0,03
2,6 - 2,9	2	0,05; 0,06
2,9 - 3,2	1	0,12

Abb.13:

Verteilung der 92 untersuchten Blut- und Serumalkoholproben



Es zeigte sich, daß die meisten Proben sich in den unteren Konzentrationsbereichen zwischen 0,5 - 1,7 ‰ befanden und Promille Werte über 2,0 nur sehr gering vertreten waren.

Die Blutproben waren dabei nicht ausgesucht, sondern entsprachen denjenigen, die tagtäglich in der Routine Untersuchung anfielen.

Die Serumlösungen waren dagegen von der Fa. Behring mit den Alkoholwerten von 0,68 b.z.w. 1,57 ‰ vorgegeben (Fluinorm Chargen Nr. 626102 b.z.w. 626202).

Die in den Untersuchungen ermittelten Konzentrationen (Mittelwert aus 5 Werten für eine Alkoholprobe) wurden mit den gaschromatographischen Ergebnissen verglichen (siehe Abb. 16, Tabelle 9) und jeweils die Standardabweichung b.z.w. der Variationskoeffizient (VK %) ermittelt.

Statistische Auswertung

Um einen besseren Überblick von Tabelle 9 zu bekommen, werden die Ergebnisse im folgenden diskutiert:

Als Vertrauensbereich werden für den Sollwert der Fluinorm Seren vom Hersteller Bereiche angegeben, die 95% der Analyseergebnisse der Referenzlaboratorien enthalten.

Dies ist bei Annahme von der Normalverteilung ein Maß für die doppelte Standardabweichung. Für das Testserum mit 0,68 ‰ ergibt sich ein Vertrauensbereich von 0,62-0,72 und für 1,57 ‰ ein solcher von 1,47-1,67.

Vergleicht man daraufhin die gefundenen Ergebnisse, so sieht man, daß sämtliche Werte innerhalb der von den Herstellern der Kontrollmaterialien definierten Vertrauensbereichen.

Es errechnet sich weiterhin ein mittlerer relativer Fehler aus 21 Serumproben von 3,6%. Im Vergleich zu Unter-

suchungen von Zink (1985; an 1394 unausgewählten Doppelbestimmungen bei Fluinorm Seren mit der automatischen ADH-Methode) ergab sich dort ein mittlerer relativer Fehler von 2,4%.

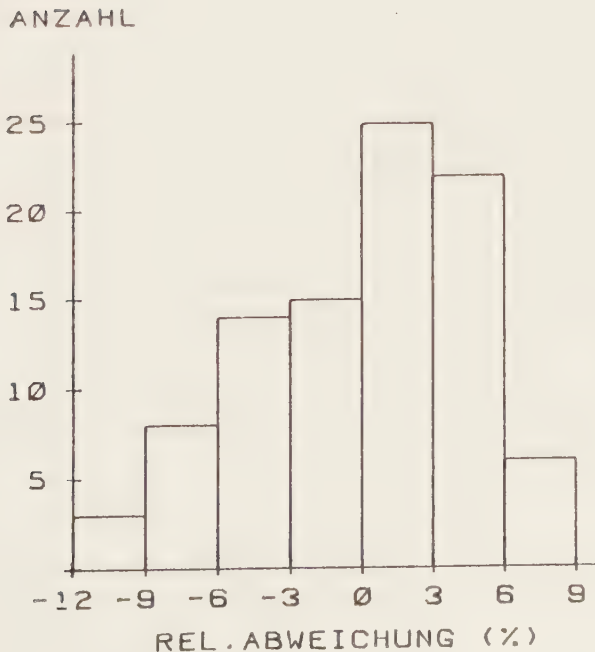
Es ist zu bedenken, daß der Fehler auch wegen der Möglichkeit der Veränderung der Serumflüssigkeit in diesen Untersuchungen erhöht sein kann, da die Probe einige Wochen gelagert und vielfältig geöffnet wurde.

Die relativen Abweichungen sowohl von Serum- als auch von Blutproben schwankten zwischen +9,09 bis -11,3%.

Abbildung 14 zeigt die gefundene Verteilungsdichte aller relativen Abweichungen vom Mittelwert.

Abb.14:

Häufigkeiten aller relativen Abweichungen bei 92 Proben.



Die Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\sum x_i - \bar{x}}{n-1}}$; x_i = Einzelmessung
 $\bar{x}$ = Mittelwert aus
 5 Einzelmessungen

der Probenuntersuchungen schwankte zwischen 0,01 - 0,11.
 Um bei der Beurteilung der Standardabweichung unab-
 hängig von den jeweiligen Mittelwerten zu sein, betrachtet
 man die Variationskoeffizienten, die durch den mathema-
 tischen Ausdruck

$$VK \% = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

definiert ist, wobei s die Standardabweichung und $\bar{x}$
 den gebildeten Mittelwert von 5 gemessenen Werten einer
 Alkoholprobe darstellt. In Abbildung 15 werden die ge-
 zeigten Häufigkeiten des Variationskoeffizienten (%)
 gezeigt.

Den systematischen Fehler der Methode erhält man durch
 Vergleich der vorgegebenen Lösungskonzentration aus der
 Gaschromatographie mit der gemessenen Konzentration.

Trägt man beide Werte gegeneinander auf, so muß
 sich bei methodisch absolut richtiger Messung eine Ge-
 rade ergeben, die durch den Nullpunkt geht und mit der
 Achse einen Winkel von 45° einschließt, also die Stei-
 gung 1 besitzt.

Diese Steigung wird in der Statistik als "Regressionskoef-
 fizient" bezeichnet. In Abbildung 16 ist die Regressions-
 rade der kinetischen ADH-Methode eingetragen.

Ihre Formel lautet: $y = 0,92x + 0,1167$

Die Zuordnung der beiden Werte ist dabei umso besser, je
 näher x dem Wert 1 und der Abschnitt auf der y-Achse dem
 Wert 0 zurückt.

In diesem Fall schneidet die Gerade die y-Achse bei
 + 0,1167.

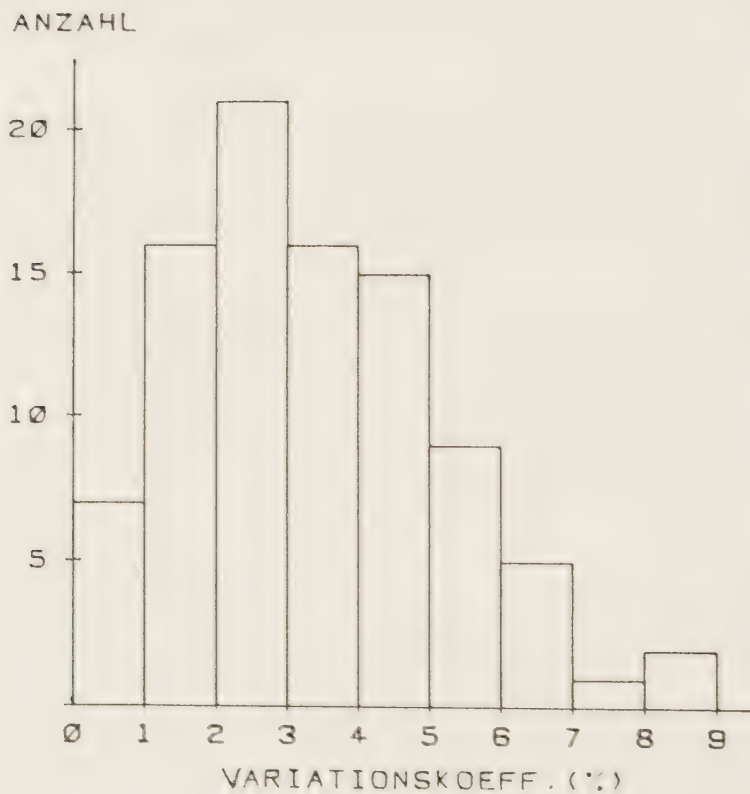
Es errechnet sich auf Grund der Graphik ein Korrelations-

koeffizient zwischen der kinetischen Alkoholbestimmung und der GC- Methode von $r = 0,9735$ bei 92 Stichproben. Im Vergleich zu der kinetischen ADH-Methode von Brown (1971) lag dazu der Korrelationskoeffizient bei $r = 0,9$ und bei Portman et al. (1980) fand sich ein solcher von $r = 0,9863$ bei 200 Blutproben.

Unter Benutzung des F-Tests für statistische Standardverfahren sind die Blut- und Serumwerte geprüft worden, wobei sich zeigte, daß mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von $S=95\%$ und $S=99\%$, die Werte des kinetischen ADH- zu dem GC-Verfahren nicht signifikant unterscheiden.

Abb. 15:

Häufigkeiten der Variationskoeffizienten (von 0-9)
bei 92 untersuchten Blut- und Serumproben.

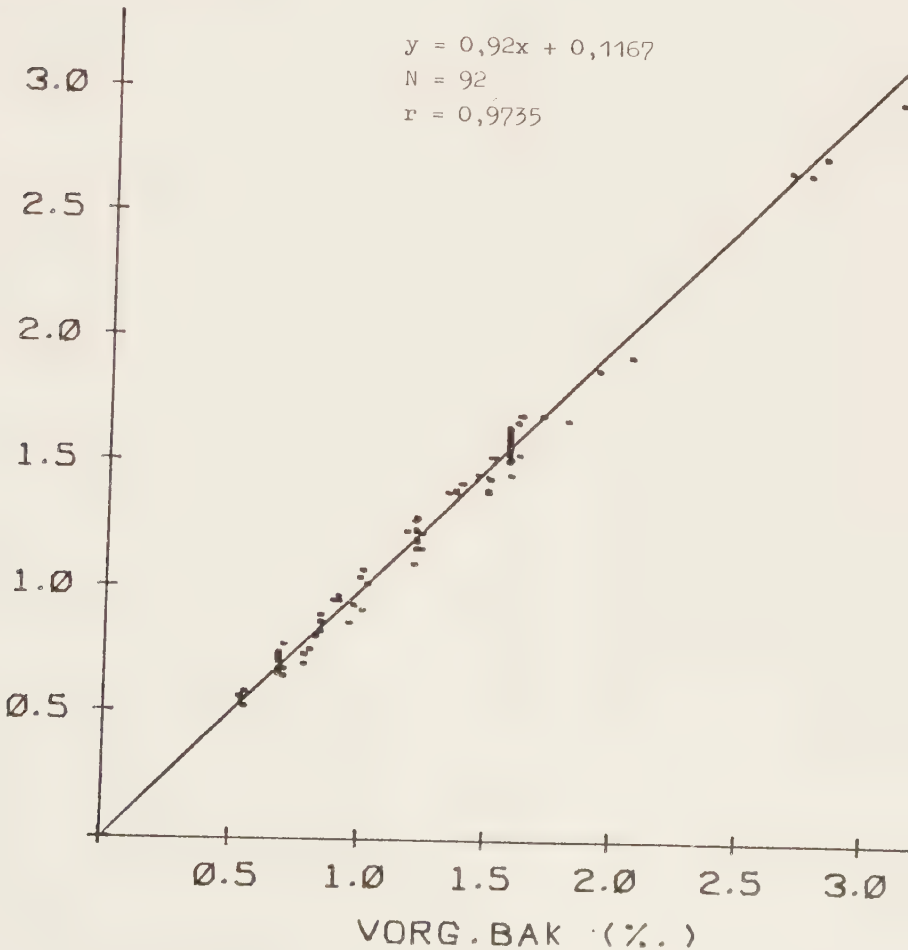


7.2. Graphik der Ergebnisse

Abb. 16:

Die Korrelation zwischen der gaschromatographischen Methode (= vorgegebene Blutalkoholkonzentration) und der kinetischen ADH-Methode (= gefundene BAK).

GEF. BAK (‰)



7.3. Tabelle der gefundenen Alkoholwerte

Tabelle 9:

Proben Nr.	Alkohol- konzent. vorgege- ben (GC)	Alkohol- konzent. gemessen (ADH) $\bar{x}$ aus 5 Einzelmes- sungen	Abweichung abs. rel. (‰) (%) der ADH-M. von der GC	Standard- abweichung	VK (%)
---------------	--	--	--	-------------------------	-----------

Serum

1	0,68	0,71	+0,03	+4,4	0,04	5,5
2	0,68	0,70	+0,02	+2,9	0,01	1,5
3	0,68	0,65	-0,03	-4,4	0,02	3,0
4	0,68	0,71	+0,03	+4,4	0,03	4,2
5	0,68	0,67	-0,01	-1,4	0,04	6,3
6	0,68	0,65	-0,03	-4,4	0,05	4,6
7	0,68	0,67	-0,01	-1,4	0,04	5,3
8	0,68	0,70	+0,02	+2,8	0,07	2,4
9	0,68	0,74	+0,06	+8,1	0,01	1,8
10	0,68	0,72	+0,04	+5,5	0,02	2,6
11	0,68	0,73	+0,05	+6,8	0,03	3,8
12	1,57	1,58	+0,01	+0,6	0,02	1,3
13	1,57	1,63	+0,06	+3,8	0,02	1,2
14	1,57	1,64	+0,07	+4,4	0,04	2,2
15	1,57	1,62	+0,05	+3,2	0,03	1,9
16	1,57	1,58	+0,01	+0,6	0,05	3,2
17	1,57	1,54	-0,03	-1,9	0,07	4,3
18	1,57	1,62	+0,05	+3,2	0,04	2,7
19	1,57	1,60	+0,03	+1,8	0,07	4,1
20	1,57	1,65	+0,08	+4,8	0,07	4,1
21	1,57	1,65	+0,08	+4,8	0,19	1,1

Proben Nr.	Alkohol- konzent. vorgege- ben (GC)	Alkohol- konzent. gemessen (ADH) $\bar{x}$ aus 5 Einzelmes- sungen	Abweichung abs. rel. ($^{\circ}/_{\infty}$) (%) der ADH-M. von der GC	Standard- abweichung	VK (%)
---------------	--	--	---	-------------------------	-----------

Blut

22	1,21	1,19	-0,02	-1,0	0,04	3,4
23	1,21	1,24	+0,03	+2,5	0,01	0,8
24	0,7	0,77	+0,07	+10,0	0,03	3,3
25	1,7	1,7	----	----	0,05	2,9
26	1,49	1,4	-0,09	-6,0	0,03	2,4
27	1,21	1,23	+0,02	+0,8	0,04	3,3
28	1,62	1,7	+0,08	+4,9	0,05	2,8
29	2,75	2,69	-0,06	-2,2	0,11	4,2
30	1,21	1,28	+0,07	+5,8	0,04	2,8
31	1,21	1,29	+0,08	+6,6	0,02	1,6
32	2,05	1,94	-0,11	-5,4	0,08	4,0
33	0,95	0,86	-0,09	-9,5	0,04	4,8
34	1,21	1,23	+0,02	+1,65	0,06	5,2
35	1,21	1,24	+0,03	+2,5	0,05	3,7
36	2,81	2,76	-0,05	-1,8	0,09	3,3
37	1,21	1,16	-0,05	-4,1	0,07	6,3
38	0,78	0,69	-0,09	-11,3	0,02	3,1
39	0,97	0,93	-0,04	-4,1	0,02	2,5
40	1,21	1,2	-0,01	-0,8	0,02	5,8
41	0,82	0,8	-0,02	-2,4	0,04	5,2
42	1,80	1,68	-0,12	-8,7	0,04	2,4
43	1,61	1,7	+0,09	+5,5	0,02	1,3
44	1,7	1,7	----	----	0,08	4,5
45	0,84	0,89	+0,05	+5,9	0,07	8,4
46	0,55	0,58	+0,03	+5,4	0,01	0,8

Proben Nr.	Alkohol- konzentr. vorgegeb. (GC)	Alkohol- konzentr. gemessen (ADH)	Abweichung abs. rel. (‰)(%)		Standard- abweichung	VK (%)
47	0,89	0,95	+0,06	+6,3	0,01	0,8
48	0,54	0,55	+0,01	+1,8	0,01	4,9
49	0,78	0,73	-0,05	-6,8	0,03	3,4
50	1,33	1,39	+0,06	+4,3	0,1	7,1
51	1,45	1,46	+0,01	+0,7	0,07	5,0
52	1,17	1,23	+0,06	+4,8	0,03	2,4
53	0,99	1,04	+0,05	+4,8	0,04	3,8
54	0,84	0,86	+0,02	+2,4	0,04	5,2
55	0,91	0,95	+0,04	+4,4	0,03	6,8
56	0,53	0,56	+0,03	+5,6	0,04	5,7
57	0,55	0,58	+0,03	+3,4	0,05	8,6
58	1,36	1,4	+0,04	+2,9	0,09	6,8
59	1,49	1,45	-0,04	-2,7	0,06	3,8
60	1,2	1,27	+0,07	+5,8	0,04	2,9
61	0,8	0,75	-0,05	-6,2	0,05	6,6
62	1,02	1,02	----	----	0,03	3,2
63	0,53	0,56	+0,03	+5,6	0,02	3,3
64	0,91	0,97	+0,06	+6,5	0,05	5,3
65	0,55	0,52	-0,03	-5,5	0,02	2,8
66	1,36	1,39	+0,03	+2,2	0,04	2,8
67	1,49	1,39	-0,1	-7,3	0,05	3,2
68	1,2	1,1	-0,01	-0,8	0,05	4,6
69	1,5	1,53	+0,03	+2,0	0,06	4,2
70	1,58	1,52	-0,06	-3,8	0,08	5,1
71	1,52	1,53	+0,01	+0,6	0,04	2,4
72	1,23	1,16	-0,07	-5,7	0,03	2,8
73	1,57	1,61	+0,04	+2,5	0,09	5,6
74	1,00	1,07	+0,07	+7,0	0,04	4,4
75	1,57	1,56	-0,01	-0,6	0,01	0,5
76	1,57	1,51	-0,06	-3,8	0,07	4,5

Proben Nr.	Alkohol- konzent. vorgegeb. (GC)	Alkohol- konzent. gemessen (ADH)	Abweichung abs. rel. ($^{\circ}/_{\infty}$)(%)		Standard- abweichung	VK (%)
77	1,5	1,44	-0,06	-4,0	0,03	1,8
78	1,58	1,46	-0,12	-7,6	0,03	1,7
79	1,39	1,42	+0,03	+2,2	0,02	1,4
80	1,23	1,22	-0,01	-0,8	0,02	1,2
81	1,57	1,57	----	----	0,05	3,0
82	1,00	0,91	-0,09	-9,0	0,01	1,0
83	0,84	0,82	-0,02	-2,4	0,02	2,5
84	3,11	2,99	-0,12	-3,8	0,07	2,5
85	1,92	1,88	-0,04	-2,0	0,03	1,5
86	2,60	2,63	+0,03	+1,2	0,09	0,4
87	0,7	0,64	-0,06	-8,5	0,03	5,1
88	1,61	1,54	-0,07	-4,3	0,08	5,4
89	0,7	0,69	-0,01	-1,4	0,05	3,4
90	1,6	1,67	+0,07	+4,4	0,02	1,4
91	1,38	1,42	+0,04	+2,9	0,02	1,5
92	1,58	1,46	-0,12	-7,61	0,02	1,8

8. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Verfahren zur kinetischen ADH-Bestimmung des Blutalkohols aufgezeigt werden.

Die Meßwerte lassen erkennen, daß sich der Reaktions-Rate-Analysator mit der vorgegebenen Meßzeit von 60 sec gut in der Weise für die Blutalkoholbestimmung verwenden läßt. Die Methode zeigt - bei Vorhandensein eines Kinetikmeßplatzes - ein einfaches kinetisches Meßverfahren zur quantitativen Alkoholbestimmung.

Wichtig für alle Messungen war dabei die Erstellung der Eichkurve mit Alkoholstandardlösungen, deren endgültige Aufstellung aber von vielen Faktoren abhängig war:

wie z. B. der ADH-Menge und deren Aktivität, den Verdünnungen der Standardlösungen, weiterhin nach Brown (1971) der NAD^+ -Konzentration und deren Qualität, der Temperatur, pH-Wert, Eigenarten der Geräte u.s.w.

Für die Durchführung der ADH-Methode stellte sich dann heraus, daß es am besten war, am Anfang und Ende der Probenansätze einer Versuchsserie einige Standardproben mitlaufen zu lassen, damit man erkennen kann, ob die Meßwerte sich im Laufe der Untersuchungen verändern.

Es wurden bei der Auswertung der Analysenergebnisse von 92 Blut- b.z.w. Serumproben die analytische Streuung von jeweils 5 Meßwerten berücksichtigt, deren Standardabweichungen von 0,01 - 0,11 betrugen.

Da die untersuchten Probenalkoholwerte sich zwischen 0,52-3,04 ‰ befanden, lagen streng genommen Mischverteilungen vor, die eigentlich nicht als Normalverteilung anzusehen sind.

Es zeigte sich jedoch bei früheren Untersuchungen von Krauland und Vidic (1958), daß die Streuungen innerhalb eines gewählten ‰ Bereiches vom Alkoholgehalt ziemlich

unabhängig ist und somit können die durchgeführten Berechnungen für Standardabweichungen b.z.w. Varianz in ihrem Aussagewert als ausreichend genau angesehen werden.

Nach den Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes (1. Gutachten) für die Blutalkoholbestimmung, ist bei Blutalkoholkonzentrationen über 1,0 Promille eine maximale Variationsbreite von 10 % des Probenmittelwertes zulässig, bei Alkoholkonzentrationen unter 1,0 ‰ jedoch einheitlich eine maximale Variationsbreite von 0,10 ‰, um den größeren Schwierigkeiten bei der Bestimmung geringerer Konzentrationen Rechnung zu tragen.

Die gefundenen Ergebnisse (Tab. 9) wurden daraufhin auf die Variationsbreite (= relative Abweichung) des Probenmittelwertes untersucht.

Es stellte sich heraus, daß nur bei einer Probe (Nr. 38) eine Variationsbreite von über 10% ermittelt wurde, da diese aber eine Blutalkoholkonzentration unter 1,0 ‰ aufweist (0,78 ‰) und somit die Variationsbreite von 0,10 ‰ gestattet ist, erfüllen alle gefundenen Ergebnisse die Forderung des 1. Gutachtens vom BGA.

Weiterhin erkennt man aus Tabelle 9, daß bei den relativen Abweichungen vergleichsmäßig eine höhere Probenanzahl mehr nach oben (52 Proben) als nach unten (40 Proben) abweicht, allerdings lag die relative Abweichung vom Zahlenwert aus gesehen nach unten höher (bis zu - 11,3%).

Wässrige Alkoholtestlösungen zeigten auch in den Vorversuchen geringere Abweichungen (mittlerer VK = 2,93 %) vom erwarteten Sollwert und damit ein exakteres Ergebnis wie im Vergleich dazu Blut- und Serumalkoholproben (mittlerer VK = 3,48%).

Ein Grund für derartige Abweichungen trotz der fortlaufenden Eichung mag auf dem unterschiedlichen Verhalten von Mischungen aus Ethanol-Wasser, Ethanol-Serum

b.z.w. Ethanol-Vollblut beruhen, wobei unterschiedliche Viskosität und Wandadhärenz sowie Probeninhomogenität nur einige Störfaktoren bei der Alkoholbestimmung darstellen.

Von verschiedenen Autoren (Krauland und Vidic 1964, Leit-hoff 1964, Arnemann und Hampl 1984) ist als mögliche Ursache die Inhomogenität des Blutes b.z.w. die Viskosität der verschiedenen Flüssigkeiten für die Abweichungen bei derartigen Versuchsreihen diskutiert worden.

Bei den Versuchen wurden für den Leerwert, der nur NAD-puffer und ADH-Zugabe enthielt, konstant Extinktionswerte von 0,03-0,14 vom Rechner angezeigt, was ja einer geringen Enzymreaktion entsprechen würde.

Nach Brown (1971) könnte dies auf einen Restalkoholgehalt der Reagentien zurückgeführt werden, da das Enzym ADH aus Hefeextrakten gewonnen wird.

Nach Schmidt et al. (1963) hat das Enzym ADH selbst auch geringe Eigenextinktion, sodaß diese Werte beim Nullwert auch darauf zurückgeführt werden können.

Der Reaktion-Rate-Analysator hat nach Portman (1980) den Vorteil, daß der individuelle Probenleerwert der Blutprobe nicht berücksichtigt zu werden braucht, da der initiale Absorptionswert für jede Probe automatisch subtrahiert wird.

Nach Zink (1985) ist die Ungenauigkeit bei jeder einzelnen Alkoholbestimmung wesentlich durch den Fehler bei der Probenentnahme und bei der Analyse bestimmt, wobei der Anteil dieser beiden Fehler an der gesamten Analysengenauigkeit als etwa gleich groß eingeschätzt wird.

Im Laufe der Untersuchungen zeigte es sich, daß für die kinetische ADH-Bestimmung nur relativ geringes Probenmaterial (25 µl) gebraucht wurde.

Dies erscheint sinnvoll, da dadurch ein brauchbarer Rest der Probe für einen mehrfachen Meßansatz oder für spätere

Nachbestimmungen übrigbleibt.

Nach Weinig (1965) sollte bei Untersuchungen mit forensischer Fragestellung nach Möglichkeit eine Methode immer eine Wiederholung des Meßvorgangs erlauben, sodaß auch Einzelwerté, die als sogenannte " Ausreißer " deklariert werden, verworfen werden können und außerdem die Richtigkeit von Analysenergebnissen durch Mittelwertsbildung verbessert werden können.

In dem vorliegenden kinetischen ADH-Verfahren kann, wie schon erwähnt, Vollblut verwendet werden. Dies bringt einen wesentlichen Vorteil mit sich, da die zeitaufwendige Deproteinisierung, wie sie bei der manuellen ADH-Methode üblich ist, wegfällt.

Auch die vollautomatische ADH-Methode ist nur für homogene Proben brauchbar, da die Verwendung von Vollblut zu Schwierigkeiten führen kann, wenn es zu einer Verstopfung der Schläuche kommt (Portman 1980, Keller 1979).

Die Bestimmung des Blutalkohols stellt, was Genauigkeit und Reproduzierbarkeit angeht, zweifellos höhere Anforderungen an einen Reaktion-Rate-Analysator, dessen Anwendungsbereich meist in der Untersuchung klinisch-chemischer Befunde liegt, da dort die Toleranzgrenzen in Bezug auf die Genauigkeit weitergefaßt sind, als dies im forensischen Bereich vertretbar wäre.

Trotzdem erlaubt dieses Gerät beim exakten Arbeiten (vor allem bei der Probenvorbereitung) auf Grund der festgestellten Ergebnisse eine zuverlässige Feststellung des Ethanolgehalts mit dem kinetischen ADH-Verfahren.

Auch für den Routinebetrieb zeichnen sich einige Vorteile ab.

So erfordert die Vorbereitung der Proben und deren Überwachung weniger Zeitaufwand als das manuelle ADH-Verfahren, wodurch Arbeitszeit eingespart werden kann und somit diese Methode auch eventuell für die Notfall Analytik in Frage kommen könnte.

In Betracht sollte auch die Rationalität und Effektivität gezogen werden. So können ca. 450-500 Probenuntersuchungen mit einer ADH-Testkombination von Boehringer Mannheim vorgenommen werden, wobei 200-300 Analysen pro Tag mit dem Auto-Analyser durchgeführt werden können (Portman 300 Proben/Tag).

9. Zusammenfassung

Es wird in der vorliegenden Arbeit über ein kinetisches ADH-Verfahren zur Blutalkoholbestimmung berichtet. Abschließend wird dieses Verfahren im Rahmen der gefundenen Ergebnisse mit der in den Blutlabors gebräuchlichen gaschromatographischen Methode verglichen.

Durch die Variation der verschiedenen Versuchsbedingungen im Probenansatz bei Alkoholstandardlösungen (Verdünnungsverhältnis der Alkoholprobe/ Wasser, ADH-Menge, Meßzeit, Veränderung der Stützstellen in der Eichkurve) wurde die bestmögliche Form der Eichkurve bestimmt (möglichst hohe Steigung, niedriger Variationskoeffizient der Eichkurvenmeßpunkte).

Nach Auswahl eines passenden Computerverfahrens wurden die Eichkurven mit Rechnerunterstützung erstellt und dann an 92 Blut- und Serumproben die Alkoholkonzentration ermittelt.

Es ergaben sich bei der Auswertung der Meßergebnisse gute Korrelationswerte zur Gaschromatographie ($r = 0,9735$), wobei die gefundenen ADH-Mittelwerte (aus 5 Einzelmessungen) sich nicht signifikant von der GC-Methode unterschieden.

Die kinetische ADH-Methode ist relativ leicht anzusetzen und zeigt nach Untersuchungsergebnissen zufriedenstellende Werte, wobei die Präzision den allgemeinen Anforderungen des 1. Gutachtens des BGA entspricht. Außerdem zeigt die Methode relativ wenig Reagentienverbrauch und erfordert nur minimale Probenmengen (25 μ l Blut - endgültiges Verdünnungsverhältnis des Blutes 1:650), d.h. es kann mit sehr geringen Mengen experimentiert werden und somit sind Wiederholungsuntersuchungen jederzeit möglich.

10. Literaturverzeichnis

1. Alha, A., Tamminen V.: Modifikation of the ADH-method in the determination of blood alkohol. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 38, 121-125 (1960)
2. Arнемann, S., Hampe, A.: Zum Meßfehler bei der forensischen Blutalkoholbestimmung. Inaug. Diss. Hannover (1984)
3. Barron, E., Levine, S.: Oxidation of alcohols by yeast alcoholdehydrogenase and by the living cell the thiol groups of the enzyme. Arch. Biochem. 41 175 (1952)
4. Bernheim, J., Sachs, V., Steigleder, E.: Systematische Untersuchungen mit dem ADH-Verfahren. Ein Beitrag zur Spezifität der Methode. Dtsch. Z. Gesamte Gericht. Med. 53, 28 (1962)
5. Bonnichsen, R., Theorell, H.: An enzymatic method for the microdetermination of ethylalcohol. Scand. J. Clin. et Lab. Invest. 3, 58-62 (1951)
6. Bosch, K.: Aufgaben und Lösungen zur angewandten Statistik. Friedrich Vieweg & Sohn, Verlagsgesch. mbh, Braunschweig (1983)
7. Brown, S., Goenechea, S., Gibson, P.: Automated Assay for Blood Alcohol with an Enzyme Reaction Rate Monitor. Blutalkohol 8, 432-441 (1971)
8. Bücher, T., Redetzki, H.: Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativen Wege. Klin. Wochenschr. 29, 615 (1951)
9. Buijten, J. C.: An automated ultra-micro distillation technique for determination of ethanol in blood and urine. Blutalkohol 12, 6, 393-398 (1975)
10. Buijten, J., Goldberg, L., Rydberg, U.: Precision and Accuracy of an automated Ultra-Micro Distillation Technique for Determinations of Ethanol in Blood and Urine. Blutalkohol 14, 405-416 (1977)

11. Cravey, R.H.: Current Status of Blood Alcohol Methods. Chromatographik Science Vol 12, (1974)
12. Curry, A. S., Walker, G.W., Simson, G.S.: Determination of Ethanol in Blood by Gas Chromatography. Analyst. 91, 742-743 (1966)
13. Deutsche Forschungsgemeinschaft: Analysen im biologischen Material. Bd 2, Verlag Chemie, Weinheim (1976)
14. Dietze, G. M., Wicklmayr, J., Grunst, K. D., Hepp, S., Braun, H.: Glykogenolyse und Gluconeogenese der menschlichen Leber unter dem Einfluß von Äthanol. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79, 911, (1973)
15. Döring, G., Forster, B., Langerkamp, J.: Erfahrungen bei der Alkoholbestimmung an etwa 13000 Blutproben mit dem automatischen ADH-Verfahren. Blutalkohol 3, 511 (1965/66)
16. Donnelly, M., Johnson, M.F., Quart, L.A.: Studies Alcohol 33, 816 (1972)
17. Dornhorst, A. A., Ouyang: Effect of alcohol on glucose tolerance. Lancet, 957, II, (1971)
18. Dotzauer, G., Redetzki, H., Johannismeier, K., Bücher, T.: Erprobung einer spezifischen Fermentmethode zur Microbestimmung von Aethylalkohol. Dtsch. Z. ges. gericht. Med. 41, 15 (1952)
19. Fenninger, H., Gibitz, H.J.: Blutalkoholbestimmung durch GC und nach der enzymatischen Methode mittels ADH. Ein Methodenvergleich. Clin. Chem., Clin. Biochem. 17, 151 (1979)
20. Fetzner, V.: Einführung in die Grundlagen der mathematischen Statistik. Alfred Hütling Verlag GmbH, Heidelberg (1973)
21. Fischer, G., Ditt, J.: Rationalisierung der Blutalkoholbestimmungen im Auto Analyser II (ADH-Verfahren). Blutalkohol 335-343, Vol 19, (1982)

22. Gibitz, H.J.: Enzymatische Microbestimmung von Blutalkohol nach Abtrennen über die Gasphase. Blutalkohol 22, 49-58 (1985)
23. Glaser, W. R.: Varianzanalyse, Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1978)
24. Greiner, H.: Zur Fehlerbreite des AHD-Verfahrens bei der Routinebestimmung des Ethylalkoholgehalts im Blut. Blutalkohol 11, 123-126, (1974)
25. Grüner, O.: Ein photometrisches Verfahren zur Blutalkoholbestimmung, Arch. Toxikologie 14, 362 (1953)
26. Grüner, O.: Ein Beitrag zur photometrischen Blutalkoholbestimmung. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 44, 771 (1956)
27. Grüner, O.: Der gerichtsmedizinische Alkoholnachweis. Köln, Berlin, Bonn, München. Carl Heymanns Verlag KG (1967)
28. Grüner, O., Audrilicky, I., Bilzer, N.: Zur Brauchbarkeit automatisierter Substratmessungen im Rahmen des ADH - Verfahrens. Blutalkohol 11, 339-347 (1974)
29. Grüner, O., Bilzer, N.: Zur Brauchbarkeit eines automatisierten Meßplatzes (" Substratmeßplatz") bei der routinemäßigen Alkoholbestimmung nach Widmark. Blutalkohol 12, 319-322 (1975)
30. Grüner, O., Ludwig, O.: Zur BAK Rückrechnung. Blutalkohol 8, 207-219 (1975)
31. Grüner, O. : Zur forensischen Verwertbarkeit der Blutalkoholbefunde (Analysenmittelwerte). Blutalkohol 14, 215-226 (1977)
32. Hauck, G., Terfloth, H.: Untersuchungen zur automatischen Blutalkoholbestimmung nach der "head-space Methode". Chromatographia 2, 309-315 (1969)
33. Hancock, J. A., Mill, F. L., Miles, J.R.; Clin. Toxicol. 4,2, 217 (1971)

34. Hannak, D., Engel, C.: Schnellbestimmung des Blutalkohols mit der ADH/REA Methode. Methodenvergleich und Bewertung. Blutalkohol Vol. 22, 371-386, (1985)
35. Hayes, E. J., Velick, S. F.: Yeast Alcohol Dehydrogenase. MW, Coenzym Binding, Reaktion Equilibria. Biol. Chemist. 225-241 (1953)
36. Holzer, H., Schultz, G., Lynene, T.: Bestimmung des Quotienten DPNH/DPN in lebenden Hefezellen durch Analyse von stationärem Alkohol und Acetaldehydkonzentration. Biochem. Z. 328, 252 (1956)
37. Jain, N. C., Cravey, R.H.J.; Chromatographic Science 10, 257, (1972)
38. Jungmichel, G.: Alkoholbestimmung im Blut. Carl Heymanns Verlag (1933)
39. Keller, H.: Über Erfahrungen mit dem automatisierten ADH-Verfahren. Blutalkohol 16, 193-198 (1979)
40. Krauland, W., Vidic, E., Freudenberg, K., Schmidt, B., Lenk, V.: Über den Beweiswert einer zweiten Blutalkoholbestimmung an länger gelagerten Blutproben. Deutsch. Z. ges. ger. Med. 50, 34, (1960)
41. Krauland, W., Vidic, E. : Statistische Untersuchungen zur Methodik der Blutalkoholbestimmung. Berliner Medizin, 43-48 (1958)
42. Krauland, W., Vidic, E.: Über die Genauigkeit von Blutalkoholbestimmungen. Blutalkohol 2, (1964)
43. Leithoff, H.: Die Automatisierung der enzymatischen Blutalkoholbestimmung (ADH-Methode). Blutalkohol 7, 453-462 (1964)
44. Lieber, S.C.: The Metabolism of Alcohol, Scientific American 3, 3-11 (1976)
45. Lundt, P.V., Jahn, E.: Gutachten des BGA zur Frage Alkohol bei Verkehrsstraftaten. Bad Godesberg: Kirschbaumverlag (1966)

46. Lundt, P.V.: Alkohol und Straßenverkehr. 2. Gutachten des BGA. Heft 52. Unter Mitwirkung von Berg, S., Gerchow, J., Grüner, O., Heifer, U. Janssen, W. (1977)
47. Machata, G.: Zur Methodik der ADH-Bestimmung. Dtsch. Z. f. gerichtl. Med. 48, 26 (1958)
48. Machata, G.: Die Routineuntersuchung der Blutalkoholkonzentration mit dem Gaschromatographen. Microchim. Acta. Wien 691-700 (1962)
49. Machata, G.: Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung. Blutalkohol 4, 252-260 (1967)
50. Machata, G.: Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung. Blutalkohol 7, 345 (1970)
51. Machata, G.: Zur Frage der "zwei voneinander verschiedenen Verfahren" zur Ermittlung der Blutalkoholkonzentration. Blutalkohol 20, 236-240 (1983)
52. Mebs, D.K., Schmidt, O., Gerchow, J.: Automatisierte Blutalkoholbestimmung nach dem ADH-Verfahren mit dem LKB Substrat Analysator 2074. Blutalkohol 16, 29-35 (1979)
53. Nahas, G. G.: Pharmacologic und epidemiologic aspects of alcohol and cannabis. New York State Journal of Medicine. (Dez. 1984)
54. Porta, E.A., Gomez-Dummm, L.A.: A new experimental approach of chronic Alcoholism. Lab. Invest. 18 (1968)
55. Portman, M., Elg, P.: Experience with an ADH-Method for the determination of blood alcohol concentration using the LKB-2086 Reaktion Rate Analyser. Blutalkohol 17, 253-258 (1980)
56. Redetzki, H., Johannismeier, K., Dotzauer, G.; Dtsch. Z. gerichtl. Med. 41. 424 (1952)
57. Redetzki, H., Johannismeier, K.; Dtsch med. Wschr. 157, (1955)

58. Redetzki, H., Johannismeier, K.: Grundlagen und Ergebnisse der enzym. Aethylalkoholbestimmung. Arch. toxicol. 16, 73-78 (1956)
59. Ripphahn, J.: Alkohol Standardlösungen zur Blutalkoholbestimmung. Kontakte 3, 26-28 (1972)
60. Sachs, V.: Zur Frage der Verdunstung von Alkohol in ordnungsgemäß verschlossenen Blutproben. Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 39, 638-645 (1959)
61. Sachs, V., Muthling, B.: Vergleichende Untersuchungen zwischen Blutalkoholbestimmung nach Widmark und nach der Ferment Methode. Blutalkohol 1, 91-99 (1961)
62. Schleyer, F., Kamm, G.: Alkoholbestimmung mit dem "Eppendorf" - Photometer. Blutalkohol 4, 335-340 (1967)
63. Schmidt, O., Schulz, G.: Fehler und Steuungen des ADH-Verfahrens. Blutalkohol 2, 137 (1963)
64. Stamm, Dankwart, W.: Qualitätskontrolle klinisch chemischer Analysen. Programmiert von Zielinski J. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1972)
65. Vidic, E.: Blutalkoholbestimmung nach dem Vanidinschwefelsäureverfahren, Blutalkohol 2, 436 (1964)
66. Weinig, E.: Probleme der forensischen Toxikologie Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 56, 125-142 (1965)
67. Wehner, H.-D.: Qualitätskontrolle und Vergleich der Blutalkoholmessungen mittels des gaschromatischen Verfahrens und des Verfahrens nach Widmark. Blutalkohol 11, (1974)
68. Wallenfels, K., Sund H.: Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. Hemmstoffe für DPN-abhängige Zinkenzyme. Biochemische Z. 329, 48 (1957)
69. Widmark, E. M. P.: Die theoretischen Grundlagen und die praktische Verwendbarkeit der gerichtlich-med. Alkoholbestimmung. Verlag Urban und Schwarzenberg. München (1932)

70. Wolf, M., Schroeder, G., Zink, P.: Erfahrungen mit der Automatisierung der forensischen Blutalkoholbestimmung. Betr. gericht. Med. 38, 249 - 253 (1980)
71. Zink, P., Schneider, B., Schroeder, G., Wolf, M.: Zur Genauigkeit der forensischen Blutalkoholbestimmung. Blutalkohol 22, 21-45 (1985)

Herrn Prof. Dr. med Spann danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. L. von Meyer für die freundliche Betreuung und den übrigen Mitarbeitern des Hauses für ihre hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Name:	Beate Faust
Geburtsdatum:	18.4.1959
Geburtsort:	München
Vater:	Dr. med. dent. Otto Alois Faust, Zahn- arzt und Arzt für Zahn-,Mund- und Kieferkrankheiten
Mutter:	Dr. med. Hildegard Faust, geb. Witt- mann
Schulbildung:	
1965-1969	Volksschule an der Rotbuchenstraße in München
1969-1978	Städt. Theodolinden Gymnasium München
Mai 1978	Abitur
Studium:	
1979-1982	Studium der Biologie an der Ludwig Maximilians Universität München
Oktober 1982	Diplomhauptprüfung in Biologie
1982-1987	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig Maximilians Universität

